

III. Biotecnologías limpias en agricultura: Fijación biológica de nitrógeno. Estructura-función de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

M. ROSARIO DE FELIPE ANTÓN



Es Doctora en Farmacia. Profesora de Investigación del CSIC. Directora del Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC. Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Fue contratada por la Universidad de California (Berkeley). Presidenta de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Es especialista en Histoquímica Vegetal y Microscopía Electrónica.

Este trabajo está realizado en colaboración con: M. Fernández-Pascual, E. Fedorova, M. P. Golvano Herrero, A. González Sama, L. Guasch Pereira, M. J. Hernández Jiménez, C. de Lorenzo Carretero, M. M. Lucas Sánchez, N. de María de la Heras, J. M. Pozuelo Guanche, J. J. Pueyo Dabad, A. Vivo Rodríguez. *Centro de Ciencias Medioambientales del C.S.I.C.* (Madrid).

El conocimiento de los procesos que tienen lugar en las plantas, objetivo principal de fisiólogos vegetales, bioquímicos, biólogos celulares y moleculares, es a veces difícil de llevar a cabo, debido a la complicada organización de la célula vegetal y a los complejos procesos del metabolismo celular a lo largo del desarrollo. Se necesita la integración de abordajes multidisciplinarios, estructurales, bioquímicos y moleculares para llegar a una interpretación real de los objetivos propuestos.

La Microscopía Electrónica, creada para observar la estructura morfológica de un tejido a nivel de orgánulos subcelulares, hace necesario extremar las precauciones para la preparación de las muestras que van a ser estudiadas, evitando los artefactos que podrían conducirnos a interpretaciones falsas. Conocer la estructura real de una célula conlleva métodos de preparación adecuados para su preservación en estado nativo.

Los métodos convencionales basados en fijación química con aldehídos u otros fijadores como permanganato potásico, formol, alcohol, etc., muy usados en microscopía óptica, han sido desplazados poco a poco por el uso de criotécnicas, por las cuales los tejidos sufren menos manipulaciones, acercándose más

al estado real. «Freeze etching», «Freeze-substitution» y «Freeze drying» fueron las primeras criotécnicas utilizadas para la preservación de la estructura y la de los componentes celulares.

La evolución que han experimentado las criotécnicas ha sido considerable, y actualmente la llamada técnica de «High-Pressure Freezing», diseñada por el Technological Institute de Zurich, que hemos utilizado en la Universidad de París «Pierre et Marie Curie» (para el estudio del transporte de O₂ en nódulos de leguminosas), conduce a la observación de las células en estado nativo, preservando la estructura hasta 1mm de profundidad.

Paralelamente a la evolución de los métodos de preparación de los tejidos para llegar al conocimiento real de las estructuras celulares, la optimización de la localización de componentes químicos también ha tenido un considerable avance.

La Histoquímica Vegetal aporta la información precisa de la localización y distribución de los componentes químicos, su observación *in situ*, con el fin de lograr una mejor interpretación de su función fisiológica y del papel que desempeñan en la célula vegetal. De este modo se evita la destrucción de los tejidos como ocurre por técnicas bioquímicas. Para ello es necesario primero tener un buen conocimiento de la estructura sobre la cual se asientan y estar familiarizado con la morfología celular, antes de realizar las localizaciones histoquímicas.

La localización de los componentes químicos *in situ* es esencial para conocer la función que desempeñan. Las técnicas de Inmunofluorescencia y de Inmunocitoquímica, consideradas actualmente las más avanzadas de la Histoquímica, han contribuido poderosamente al conocimiento de la estructura-función a nivel de microscopía óptica y electrónica respectivamente. Estas técnicas, junto con las de Hibridación *in situ*, mediante las cuales podemos observar en los tejidos la expresión de genes *in situ*, constituyen hoy poderosas herramientas que han repercutido poderosamente en los avances de la Biología Molecular de Plantas y han hermanado a biólogos celulares, bioquímicos y biólogos moleculares.

Las técnicas cuantitativas, para cuantificar alteraciones celulares a nivel morfológico o histoquímico (Análisis de imagen) son también de gran interés. Entre estas técnicas cuantitativas merece destacar el Microanálisis de Rayos X (Microscopía Electrónica Analítica), mediante la cual se pueden cuantificar los nutrientes inorgánicos en las células, al mismo tiempo que su localización.

El conocimiento de la relación Estructura-Función de cualquier proceso biológico dependerá de la buena integración de las técnicas arriba citadas junto a técnicas bioquímicas y moleculares. Es recomendable el trabajo conjunto de equipos de investigación formados por especialistas de diferentes disciplinas.

1. ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSA

La agricultura intensiva ha llevado a la contaminación de suelos y aguas, debido al abuso de fertilizantes y fitosanitarios para obtener grandes producciones. Como alternativas a la agricultura intensiva, las biotecnologías limpias, basadas en el uso de los microorganismos del suelo como activadores del crecimiento, están adquiriendo especial relieve por ser respetuosas con el Medio Ambiente.

Desde 1985 nuestro grupo de investigación viene trabajando en Fijación biológica de nitrógeno con plantas leguminosas, que tienen gran importancia agronómica, son base de la dieta mediterránea y tienen características propias y exclusivas, como fijar nitrógeno en sus raíces. Esta propiedad, unido a que además sus raíces ayudan a la reconstrucción de suelos degradados por diferentes estreses, hace que las leguminosas puedan ser utilizadas para mejorar las características físico-químicas y nutricionales de zonas áridas y semiáridas.

Las leguminosas fijan nitrógeno del aire mediante simbiosis con bacterias del suelo de las familias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaceae* (géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*) en unas estructuras llamadas nódulos. Ello es posible por la existencia del enzima nitrogenasa en el citoplasma de estas bacterias. El proceso de fijación de N_2 por la nitrogenasa es extremadamente caro en términos de la energía requerida para el funcionamiento del enzima:



Como todos los organismos aeróbicos, los nódulos requieren oxígeno para la producción de ATP, pero al mismo tiempo la nitrogenasa ha de estar protegida, pues es inactivada por concentraciones altas de oxígeno.

La simbiosis beneficia a la planta suministrándole compuestos nitrogenados, amidas o ureidos, metabolizados a partir del amoníaco. Las bacterias, en reciprocidad, reciben de la planta energía y los esqueletos carbonados para que puedan ejecutar el proceso de fijar nitrógeno.

En los estadios previos al reconocimiento recíproco, ambos simbiosiontes emiten señales químicas características. Las raíces excretan sustancias de tipo flavonoide específicas, que inducen la expresión de genes *nod* en los rizobios. Los productos de los genes *nod* son responsables de la curvatura del pelo radicular y de la inducción de la división de las células corticales que darán lugar al primordio nodular. Las bacterias aprovechan esta curvatura del pelo radicular para entrar en la planta. Como reacción a la entrada de la bacteria, la planta forma el canal de infección. La entrada a través del canal de infección es el patrón general utilizado por los rizobios en las leguminosas.

1.1. Simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*

Lupinus albus cv Multolupa, altramuz dulce, cultivar obtenido por un investigador chileno, el Doctor Van Bauer, puede ser consumido por el hombre y el ganado, pues está privado de los alcaloides típicos de este género (Figura 1). Pertenecen a la Subfamilia *Papilionoideae*, Tribu *Genisteae*, Subtribu *Lupininae*, de la que es el único representante. Las semillas de lupino tienen un alto contenido de proteínas (30-40%) al igual que las de soja, siendo muy apreciadas en los países hispano-americanos para obtener harina de pan, galletas, fibra vegetal, e incluso son usadas para controlar los niveles de glucosa en la diabetes tipo 2.



FIGURA 1. Planta de *Lupinus albus* cv. *Multolupa* en floración. Finca La Higuera, Santa Olalla (Toledo).

El lupino es una de las leguminosas que mayor cantidad de N fija en el suelo, repercutiendo positivamente sobre el Medio Ambiente y la Agricultura. Posee una serie de características, tales como la capacidad para solubilizar y absorber elementos del suelo, gracias a su sistema radical extensivo (raíces proteoides), y la supervivencia en suelos con escasez de agua y nutrientes y acidez alta. *Lupinus* es una de las pocas leguminosas que no posee micorrizas, y la absorción del fósforo del suelo se produce gracias a sus raíces proteoides. Además puede considerarse una de las leguminosas con mayor tolerancia a diferentes estreses abióticos, como nitrato (de Lorenzo y col., 1993; Lang, 1990; Lang y col., 1993), salinidad (Fernández-Pascual y col., 1996), herbicidas (De María, 2004; De María y col., 2006), sequía, etc. También puede acumular en

sus raíces metales pesados como Cd (Zornoza y col., 2002; Carpena y col., 2003), Hg, Pb, Zn (Pastor y col., 2003) y Cr, lo que le hace ser un potencial fitorremediador de sistemas contaminados.

Las especies del género *Lupinus* establecen simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*, en el cual sólo hay una especie definida: *Bradyrhizobium japonicum*. El resto de las especies se nombran con el nombre del género seguido de la especie de leguminosa que nodulan. En el caso de *Lupinus*: *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Actualmente está considerada como una de las simbiosis más efectivas.

La simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus* no sigue el patrón general de infección a través de los pelos radiculares como lo hacen la mayoría de las leguminosas. El nódulo de lupino, aunque de carácter indeterminado, presenta características propias, constituyendo el tipo denominado lupinoide (Figura 2). Sus características estructurales han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo de investigación (de Lorenzo, 1992).



FIGURA 2. Nódulos de *Lupinus albus* crecidos en raíces secundarias.

1.1.1. Estructura de los nódulos

La Figura 3 muestra un nódulo de lupino al microscopio óptico. Está formado por una corteza externa de células alargadas más o menos isodiamétricas, una corteza media de células irregulares de mayor tamaño y de paredes engrosadas, una corteza interna y una zona central que corresponde a la zona infectada. Los haces vasculares por los que se comunica el nódulo con la raíz se sitúan en la corteza interna. Al contrario que la mayoría de las leguminosas, la zona infectada del nódulo de lupino está formada por células infectadas única-

mente, no existiendo células no infectadas, lo que constituye otra característica de esta planta. En las células infectadas, las bacterias se transforman en bacteroides, rodeándose de una membrana de origen vegetal que es la llamada «membrana peribacteroidal». La unidad fijadora de nitrógeno o «simbiosoma» está constituida por uno o más bacteroides rodeados de la membrana peribacteroidal, que les separa del citosol de las células infectadas (Cabezas de Herrera y Fernández-Pascual 1982; Fernández-Pascual, 1984).

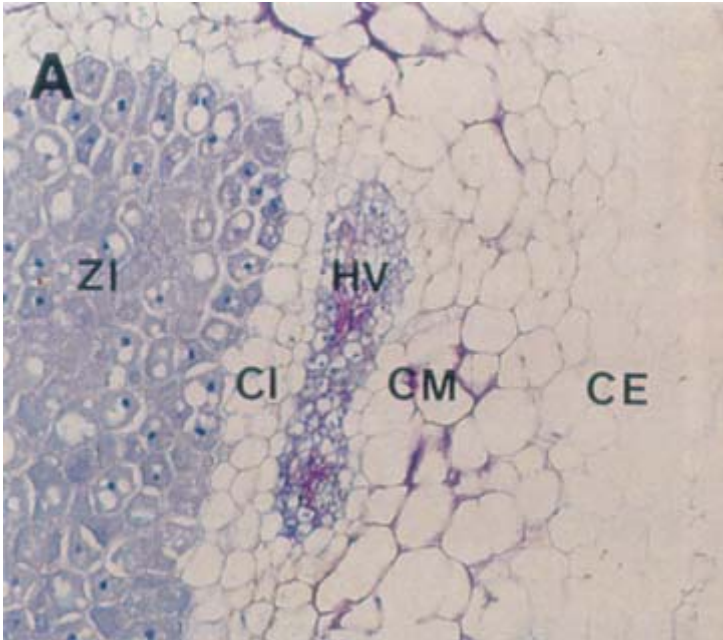


FIGURA 3. Nódulo de *Lupinus albus* incluido en Paraplast y teñido con toluidina. ZI, zona infectada; HV, haces vasculares; CI, corteza interna; CM, corteza media; CE, corteza externa.

Los bacteroides de *Bradyrhizobium* ocupan la mayor parte de la zona infectada. Junto a ellos se encuentran orgánulos subcelulares como amiloplastos, mitocondrias y peroxisomas. A su vez, los bacteroides observados al microscopio electrónico son de tipo multiforme, contienen reservas de polihidroxybutirato y polifosfato (Figura 4). Pero su principal característica es su capacidad para fijar nitrógeno, gracias a que, como se ha mencionado anteriormente, poseen el enzima *nitrogenasa*, que transforma el nitrógeno atmosférico en amoníaco y posteriormente por acción de otros enzimas del metabolismo del nitrógeno, glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH), el amoníaco se transforma en aminoácidos y éstos en amidas que son transportadas a la parte aérea de la planta.

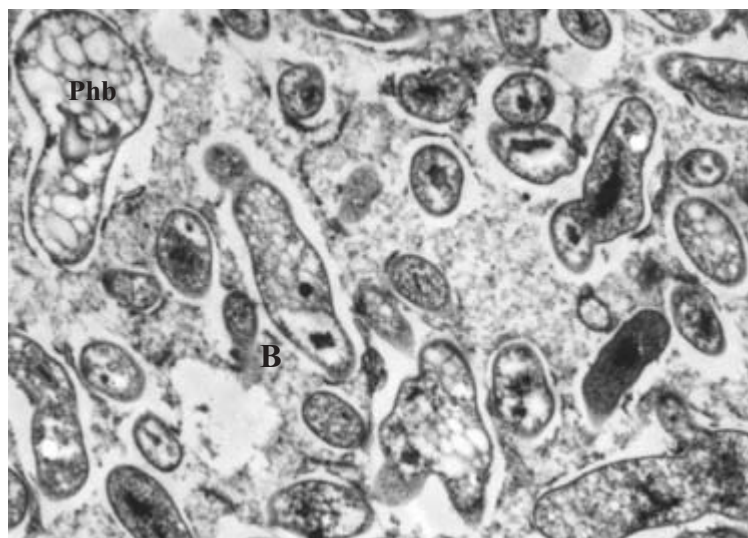


FIGURA 4. *Bacteroides* de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) de nódulos procesados para su observación por Microscopía Electrónica de Transmisión. B, *Bacteroides*. Phb, polihidroxibutirato.

1.1.2. Infección en la simbiosis *Bradyrhizobium*-*Lupinus*

Como hemos mencionado anteriormente, la infección de las raíces de *Lupinus* por *Bradyrhizobium* no obedece al patrón general de las leguminosas a través de los pelos radicales, sino que posee características propias (González-Sama, 2003). Aplicando diferentes tipos de microscopía (óptica, láser-confocal y electrónica en todas sus variantes), técnicas de inmunomarcado, y especialmente usando como marcador la Green Fluorescens Protein (GFP), hemos podido realizar el estudio de esta «peculiar simbiosis».

a) Colonización de la superficie de la raíz e infección de las células corticales

El reconocimiento de ambos simbioses se inicia mediante la excreción de los exudados de la raíz, adhiriéndose las bacterias a la superficie de los pelos radicales. Cuatro días después se observan las bacterias inmersas en excreciones mucilaginosas (Figura 5 A, B) que han sido identificadas como glicoproteínas por el anticuerpo monoclonal MAC 265. La entrada en la corteza de la raíz se realiza por vía intercelular (Figura 5 C) y la infección se produce en una única célula situada bajo el pelo radical (Figura 5 D). Las bacterias se liberan en esta primera célula infectada mediante estructuras alteradas de la pared celular (Figura 6 A, B). Como se ha mencionado, no se observan canales de infección (González-Sama y col., 2004).

b) Formación del primordio nodular

La célula cortical infectada se divide, durante varios ciclos, dando lugar a células hijas infectadas (Figura 6 A, 7 A). Las células de alrededor no infectadas, se dividen simultáneamente, dando lugar al primordio nodular que presenta dos zonas diferentes: zona central, origen de la zona infectada del nódulo (Figura 7) y zona cortical, que presenta células no infectadas en división, origen de la corteza nodular. La división de las células infectadas y el reparto de bacterias antes de la citocinesis (Figura 7 C-D) es una característica del nódulo de altramu, que no poseen la mayoría de los nódulos de leguminosas estudiados hasta ahora (González-Sama y col., 2004).

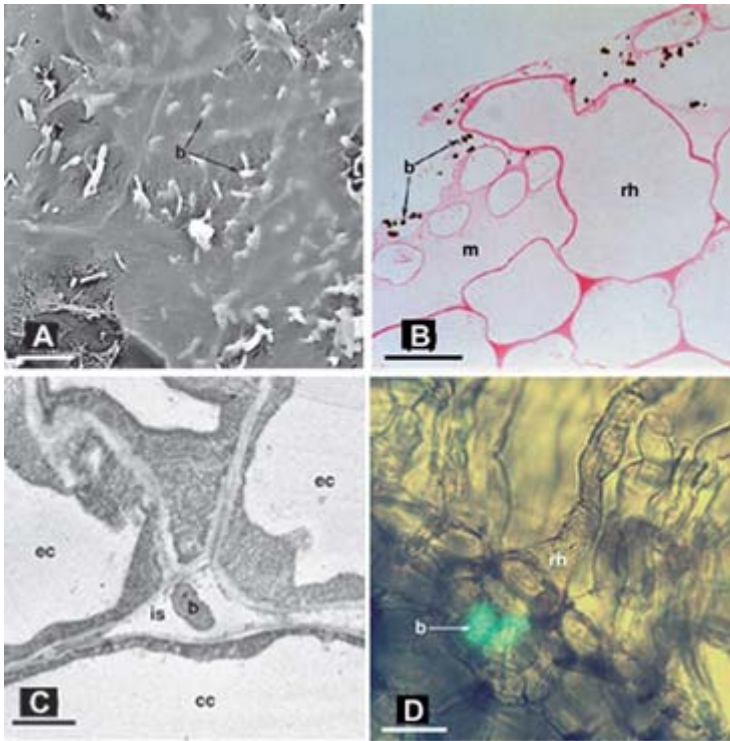


FIGURA 5. Colonización bacteriana e infección de las raíces de *Lupinus albus*. **A**, Imagen de microscopía de barrido a baja temperatura mostrando bacterias de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU 16, embebidas en un mucigel, cuatro días después de la inoculación. Barra: 10 μ m. **B**, Microfotografías de campo claro mostrando células de ISLU 16 inmunomarcadas en secciones de raíz teñidas con fuchsin básica. Barra: 20 μ m. **C**, Microfotografía electrónica de transmisión de una célula de *Bradyrhizobium* localizada en un espacio intercelular de células epidérmicas, cinco-seis días después de la inoculación. Barra: 2 μ m. **D**, Microfotografía de fluorescencia de una raíz inoculada con *Mesorhizobium loti* marcada con GFP, mostrando el foco de infección debajo del pelo radical. Barra: 50 μ m. B, bacteria; ec, célula epidérmica; cc, célula cortical; is, espacio intercelular; m, mucigel; rh, pelo radical.

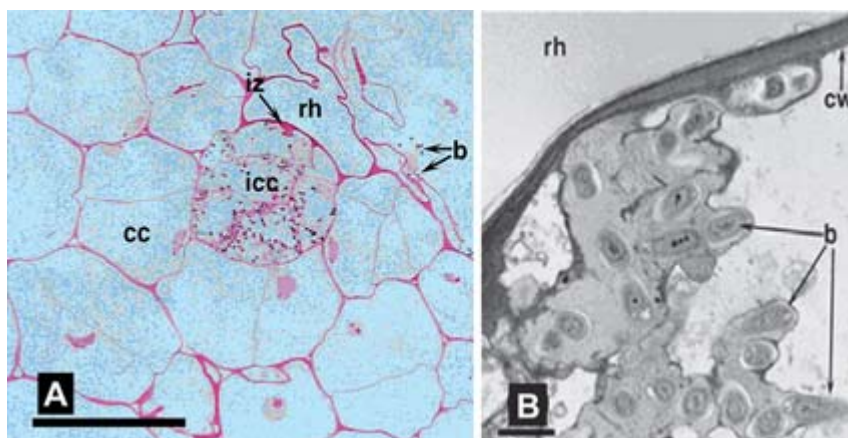


FIGURA 6. Invasión celular de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU 16, seis días después de la inoculación. **A**, Microfotografía de campo claro mostrando la zona de infección a través de la pared de la célula cortical, y células infectadas y no infectadas en división. Barra: 50 μm . **B**, microfotografía electrónica de la zona de infección con bacterias inmersas en la matriz de infección. Barra: 2 μm . b, bacteria; cc, célula cortical; cw, pared celular; icc, células corticales infectadas; iz, zona de infección; rh, pelo radical.

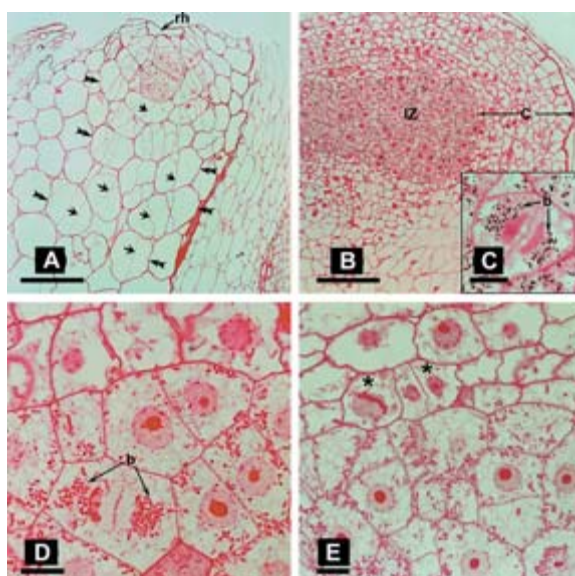


FIGURA 7. Desarrollo del nódulo de *Lupinus albus*. **A**, Microfotografía de un primordio nodular, nueve días después de la inoculación, teñido con fuchsin básica, en el que se aprecian la zona de células corticales en división (doble punta de flecha) y paredes de células recién divididas (punta de flecha). Barra: 100 μm . **B**, Primordio nodular, once días después de inocular, mostrando células en división en la zona infectada y la corteza. Barra: 100 μm . **C**, Detalle de una célula infectada en división. Bacterias de ISLU 16 inmunomarcadas. Barra: 10 μm . **D**, **E**, Detalle de células en la zona infectada y la corteza mostrando diferentes estados de división (*). Barra: 10 μm . b, bacteria; c, corteza; iz, zona infectada, rh, pelo radical.

1.1.3. *Factores que regulan la concentración de oxígeno en la simbiosis Bradyrhizobium-Lupinus*

El enzima nitrogenasa es inactivada por el oxígeno. Por ello, la concentración de oxígeno está limitada en el interior del nódulo, para lo cual la planta cuenta con varios mecanismos de regulación:

1.1.3.1. Leghemoglobina (hemoglobina de las plantas)

La leghemoglobina (Lh) es la proteína mayoritaria del nódulo, cuya función es transportar oxígeno a los bacteroides, transformada en oxileghemoglobina. Se cree que a su síntesis contribuyen ambos simbioses, bacteria y planta, y aparece cuando el nódulo está formado morfológicamente. La primera definición de nodulina incluía a toda proteína de la planta que se encontraba exclusivamente en el nódulo. La leghemoglobina es la más característica del nódulo por ser la más abundante. Se la denomina «nodulina tardía» por expresarse después del desarrollo morfológico del nódulo. Su presencia es imprescindible para que la fijación de nitrógeno pueda realizarse. Para cumplir esta función el Fe del grupo hemo debe estar en forma reducida (Fe^{2+}), existiendo reductasas en el nódulo para controlar la oxidación.

Por el importante papel que juega esta proteína, su localización fue motivo de estudio por laboratorios de diversos países, siendo los resultados muy contradictorios. Las técnicas bioquímicas utilizadas de separación por ultracentrifugación de los constituyentes del nódulo no son recomendables para conocer con exactitud y específicamente la localización celular de un componente nodular determinado, ya que durante la separación de los orgánulos se producen contaminaciones que conducen a la obtención de artefactos.

a) *Localización de la Lh por técnicas inmunocitoquímicas*

El uso de estas técnicas es de gran valor en los estudios de Biología Vegetal, pues permiten la localización específica y exacta de los componentes químicos en los tejidos. Cualquier componente con capacidad de poder ser extraído de la célula, purificado y obtenido su anticuerpo, puede ser localizado específicamente por técnicas inmunocitoquímicas. Pueden ser aplicadas en microscopía electrónica, con anticuerpos unidos a oro coloidal, y en microscopía óptica, en cuyo caso se necesita intensificar las partículas de oro coloidal con plata, por la técnica del «silver enhancement». El primer componente nodular localizado por estas técnicas fue la «uricasa», que por mucho tiempo se creyó que estaba en las células infectadas de nódulos determinados de soja, comprobándose por inmunocitoquímica que estaba en los peroxisomas de las células no infectadas (VandenBosch and Newcomb, 1986). Este estudio constituyó uno de los primeros trabajos relacionando inducción de nodulinas con el desarrollo y función de los nódulos.

La localización de la leghemoglobina constituyó un tema de debate durante largos años, pues los resultados eran contradictorios. Por técnicas bioquímicas, la localización se encontró bien en el espacio peribacteroidal o en la membrana del bacteroide, por lo que creímos necesario realizar la localización por técnicas inmunocitoquímicas para conocer la localización real de la Lh en el nódulo de lupino.

A pesar de disponer del anticuerpo anti-leghemoglobina de soja, éste no fue reconocido por lupino, por lo que fue necesario extraer el antígeno Lh a partir de nódulos de lupino y una vez purificado obtener el anticuerpo policlonal, haciendo una caracterización posterior de las inmunoglobulinas. Se obtuvo un anticuerpo primario con un título muy alto de gran especificidad. La localización se realizó con un anticuerpo secundario cabra-anticonejo unido a oro coloidal (Vivo y col., 1989).

La Figura 8 muestra la localización de Lh en las células infectadas. En la Figura 8A se muestra la localización en el citosol y en la membrana peribacteroidal de los bacteroides de *Bradyrhizobium*. Estos resultados contradecían resultados anteriores sobre la localización de la Lh en el espacio peribacteroidal. En la Figura 8B se muestra la leghemoglobina en el núcleo de las células infectadas.

La localización de la Lh por técnicas inmunocitoquímicas representó un importante hallazgo en el campo de la fijación de nitrógeno, en lo concerniente a los mecanismos de regulación de oxígeno. El oxígeno transportado desde la superficie del nódulo a través de los espacios intercelulares de la corteza, llega a la zona infectada y en la interfase corteza-zona infectada es atrapado por la leghemoglobina que, transformada en oxileghemoglobina, libera el oxígeno de una manera paulatina a los bacteroides, desde la membrana peribacteroidal a la membrana bacteroidal, donde se encuentra la cadena respiratoria.

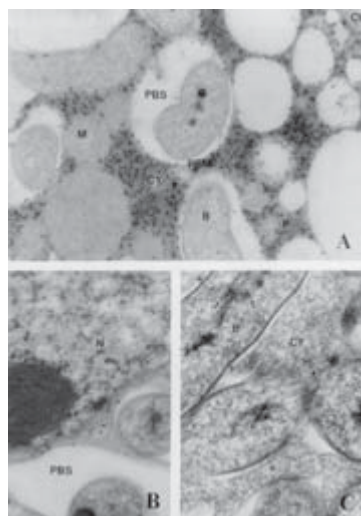


FIGURA 8. Secciones ultrafinas de células infectadas. **A**, Sección inmunomarcada con anti-leghemoglobina de lupino x 32.000. **B**, Las mismas secciones que **A**, mostrando inmunolocalización en el núcleo x 65.000. **C**, Sección incubada con suero preinmune x 78.000. B, bacteroid; CW, pared celular; CY, citosol; M, mitocondria; N, núcleo; P peroxisoma; PBM, membrana peribacteroidal, PBS, espacio peribacteroidal.

Nuestro anticuerpo anti-leghemoglobina de *Lupinus* ha sido utilizado por investigadores del Instituto Max Planck en el Departamento de Biología Molecular de Plantas para sus estudios de movilidad de proteínas.

b) *Estudio de la estructura real del simbiosoma.*
Técnica de High Pressure Freezing

Conocida la localización espacial de la leghemoglobina por técnicas inmunocitoquímicas en el citosol del nódulo y en la membrana peribacteroidal, se abrió un nuevo interrogante acerca de cómo es transportado el oxígeno hasta los bacteroides.

El hecho de no existir leghemoglobina en el espacio peribacteroidal conducía a la hipótesis de la existencia de un «carrier» en el simbiosoma, un transportador de oxígeno desde la membrana peribacteroidal (PBM) a la bacteroidal (BM). Se llegó a especular sobre la posible existencia de transportadores enzimáticos de oxígeno situados en el espacio peribacteroidal, tipo ATPasas.

Sin embargo, al observar los espacios peribacteroidales vacíos al microscopio electrónico, la hipótesis de los transportadores enzimáticos no convenció a nuestro equipo de investigación y creímos conveniente profundizar en la relación entre la célula hospedadora y el microsimbionte (*Bradyrhizobium*), para lo cual se hacía necesario estudiar la estructura del nódulo por técnicas que pusieran de relieve su estructura real, pues la observación del espacio peribacteroidal por técnicas convencionales podría ser un artefacto.

La observación de la célula en estado nativo supone la crioinmovilización de los componentes morfológicos y químicos mediante velocidades muy altas de enfriamiento para evitar la formación de cristales de hielo que causan serios daños a los tejidos (Studer y col., 1992). Esto se logra congelando el agua de las células al estado amorfo (vitrificación). La técnica llamada «High Pressure Freezing» (HPF) cumple estos requisitos, y es el único método hasta la actualidad capaz de crioinmovilizar con seguridad hasta 500 µm de tamaño en su estado nativo (Moor, 1987).

En 1996 no existía ningún equipo en España de High Pressure-Freezing. El trabajo lo realizamos en la Universidad Pierre et Marie Curie en París, con un HPF 010 Bal-Tec (Liechtenstein). Nuestro objetivo fue comparar la estructura de nódulos de *Lupinus albus* y *Phaseolus vulgaris* observada por procesamiento convencional con la obtenida por HPF, poniendo especial atención a la constitución morfológica del simbiosoma.

Los resultados obtenidos mostraron claramente que la membrana peribacteroidal está en estrecho contacto con la membrana bacteroidal (Figuras 9 y 10) en ambos tipos de nódulo, dejando un espacio peribacteroidal muy reducido entre ambas membranas, al contrario de cómo se había observado por técnicas

anteriores. El estrecho espacio peribacteroidal aparecía como una matriz densa a los electrones, lo que corrobora la posible existencia de enzimas y proteínas en este espacio (Katinakis y col., 1988).

El estudio por HPF nos ha permitido conocer cómo se transporta el O_2 liberado por la leghemoglobina desde la membrana peribacteroidal directamente a la membrana bacteroidal y a los bacteroides. Un estrecho intercambio de nutrientes y metabolitos entre ambos simbiosomas, planta y bacteria, puede tener lugar con normalidad entre ambas membranas.

Mediante la aplicación del HPF al estudio morfológico del nódulo se observó la relación espacial entre las cisternas de retículo endoplásmico y el aparato de Golgi con la membrana peribacteroidal, lo que indica que estas estructuras podrían estar relacionadas con la formación del simbiosoma (Figura 9 y 10). La técnica HPF permite una excelente preservación de los tejidos y constituye la técnica apropiada para estudiar aspectos funcionales en el desarrollo de los nódulos. Las técnicas convencionales con procesamientos largos de los tejidos, fijación, deshidratación, imbibición, inclusión en plásticos, etc., introducen problemas de osmolaridad, por lo que no son adecuadas si se desea una buena preservación de la estructura. La aplicación de HPF puede también ayudar a investigar en su estado nativo el proceso de formación del simbiosoma, y a profundizar desde su origen en la relación estructura-función de este orgánulo subcelular, existente únicamente en leguminosas (de Felipe y col., 1997).

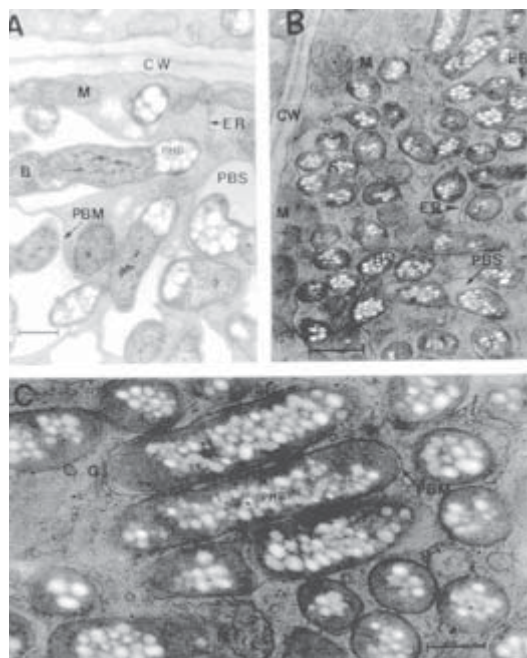


FIGURA 9. Microfotografías electrónicas de nódulos de *Phaseolus vulgaris*. **A**, Nódulos fijados químicamente mostrando varios simbiosomas en células infectadas. Barra: 0,5 μ m. **B**, Nódulos procesados mediante HPF, mostrando cisternas del retículo endoplásmico unidos a los simbiosomas. Barra: 1 μ m. **C**) Bacteroides rodeados de la membrana peribacteroidal. Barra: 0,5 μ m. B, bacteroids; CW, pared celular; ER, retículo endoplásmico; G, aparato de Golgi; M, mitocondria; PBM, membrana peribacteroidal; PBS, espacio peribacteroidal; PHB polihidroxibutirato.

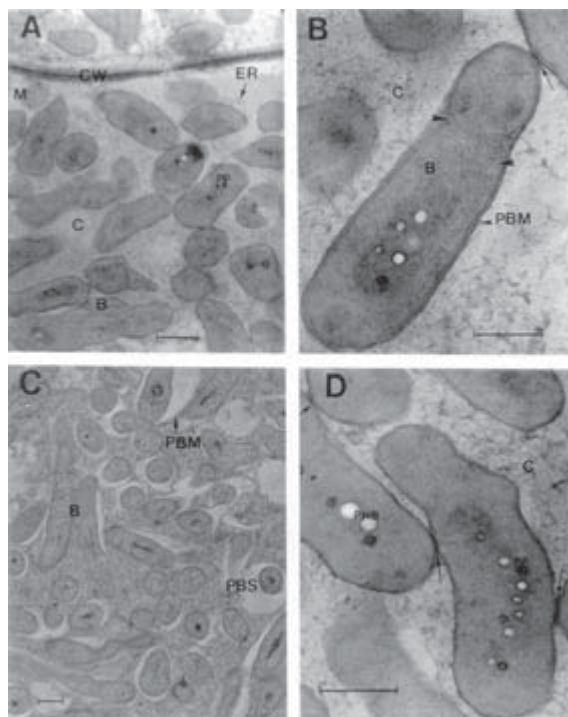


FIGURA 10. Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de nódulos de *Lupinus albus*. **A**, Vista general de células infectadas de nódulos tratados con HPF. **B**, Detalle de bacteroides mostrando la membrana peribacterioal estrechamente unida al bacteroide. **C**, Vista general de células infectadas de nódulos tratados mediante la técnica convencional. Las diferencias entre los espacios peribacterioales de A y C son claramente visibles. **D**, Puntos de contacto entre bacteroides. B, bacteroides; C, citosol; CW, pared celular, ER, retículo endoplasmico; G, aparato de Golgi; M, mitocondria, PBM, membrana peribacterioal; PBS, espacio peribacterioal; PHB, polihidroxibutirato; PP, polifosfato.

1.1.3.2. Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno

Constituye otro de los mecanismos de regulación de oxígeno en los nódulos de leguminosas (de Lorenzo, 1992). Como se ha mencionado, el oxígeno difunde desde la superficie externa al interior del nódulo a través de los espacios intercelulares hasta la zona infectada donde es atrapado por la Lh. El uso de un microelectrodo de oxígeno para seguir la concentración de O_2 desde la superficie al interior del nódulo, da como resultado una disminución drástica a partir de la corteza media, lo que parece indicar que esta estructura regula el acceso de O_2 a la zona central del nódulo donde se encuentran los bacteroides.

La corteza media de *Lupinus albus* (Figura 11), está formada por dos o tres capas de células de mayor tamaño que las de la corteza externa e interna con grandes espacios intercelulares y paredes engrosadas. La tinción con ácido periódico-base de Schiff, usada rutinariamente para la localización de hidratos de carbono, muestra una tinción intensa de las paredes celulares de la corteza media y de la matriz de los espacios intercelulares, lo que indica su constitución hidrocarbonada (Figura 12).

Con el fin de conocer exactamente la naturaleza hidrocarbonada de la matriz de los espacios intercelulares, aplicamos técnicas inmunocitoquímicas con anti-

cuerpos monoclonales obtenidos en el laboratorio del Doctor N. J. Brewin (John Innes Institute, Norwich, Inglaterra) contra componentes de nódulos de guisante. Los anticuerpos empleados, MAC 265 y MAC 236, habían localizado *in situ* una glicoproteína de guisante en los canales y gotas de infección (Van-denBosch y col., 1989).

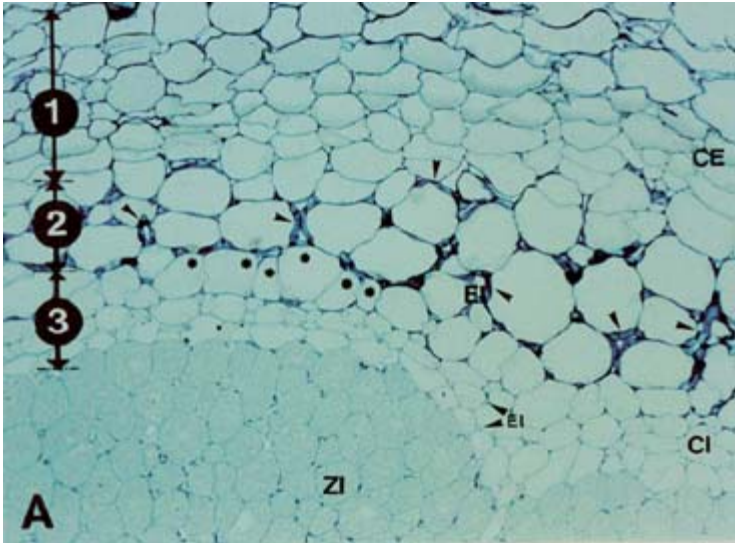


FIGURA 11. Detalle de la corteza del nódulo de *Lupinus albus*. Sección radial. CE, corteza externa (1), Corteza media (2). X 300, Corteza interna (3). EI, espacio intercelular; ZI, zona infectada.

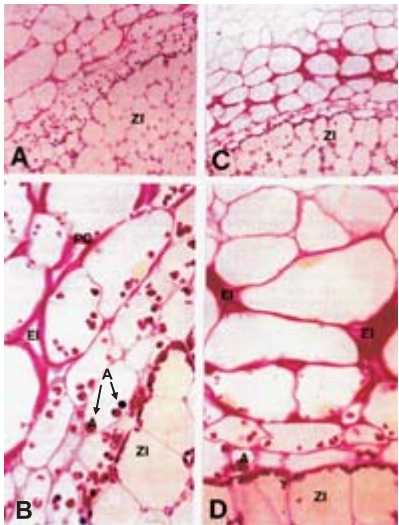


FIGURA 12. Localización histoquímica de carbohidratos en el nódulo de altramu. A, Nódulo control. X 200. B, Detalle de A. X 600. C, Nódulo tras cuatro días de exposición a 20 mM de nitrato potásico. X 200. D, Detalle de C. X 600. A, almidón; EI, espacio intercelular; PC, pared celular; ZI, zona infectada.

También ambos anticuerpos habían reaccionado con una única banda de 95 kDa en extractos solubles de guisante mediante electroforesis desnaturalizante e inmunoblotting obteniendo los mismos resultados en extractos de judía y soja (Vanden Bosch y col., 1989) y en especies de los géneros *Vicia* y *Lathyrus* (Pozuelo y col., 1993). Sin embargo, en extractos de *Lupinus albus* el anticuerpo MAC 236 reconoció una banda de 240 kDa, mientras que el MAC 265 reconoció una única banda de 135 kDa (de Lorenzo y col., 1993). Los resultados sugirieron que en lupino los dos epítomos pueden pertenecer a dos glicoproteínas estrechamente relacionadas, pero con funciones diferentes. Nuestro objetivo se centró en determinar estas funciones en la regulación de oxígeno y en su localización en la corteza media del nódulo.

La Figura 13 muestra la localización del antígeno MAC 236 en los espacios intercelulares de las células de la corteza media del nódulo de lupino mediante microscopía óptica y electrónica.

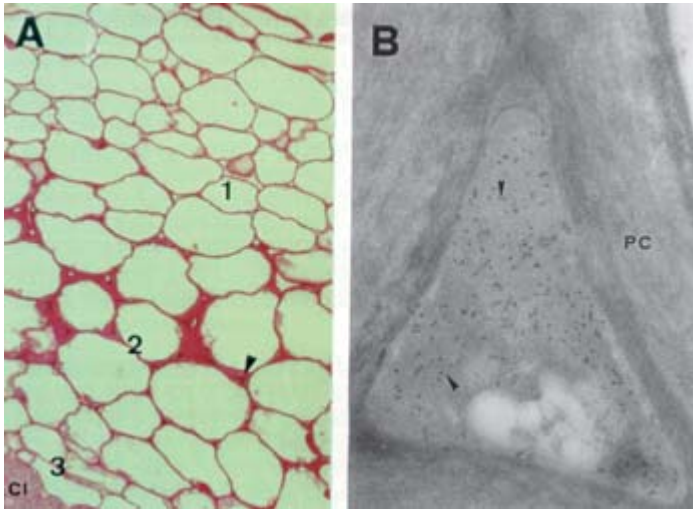


FIGURA 13. Inmunolocalización de la glicoproteína reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 236 en nódulos de altramuze, al microscopio óptico (A) y electrónico (B). A, Corteza externa (1), corteza media (2) y corteza interna (3). x 200. B, Espacio intercelular de zona 2. x 43.900. CI, células infectadas; PC, pared celular.

Para conocer el comportamiento de la corteza media como posible barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, comparamos la localización inmunocitoquímica en plantas crecidas en condiciones normales y en presencia de nitrato, que como se ha mencionado tiene un efecto negativo sobre la fijación de N_2 . El nitrato inhibe la fijación de nitrógeno, ya que la absorción de nitrato consume la energía que los bacteroides necesitan para fijar nitrógeno en las raíces. En la Figura 14 se observa la localización del MAC 236 en nódulos radicales de plantas control y crecidas con nitrato.

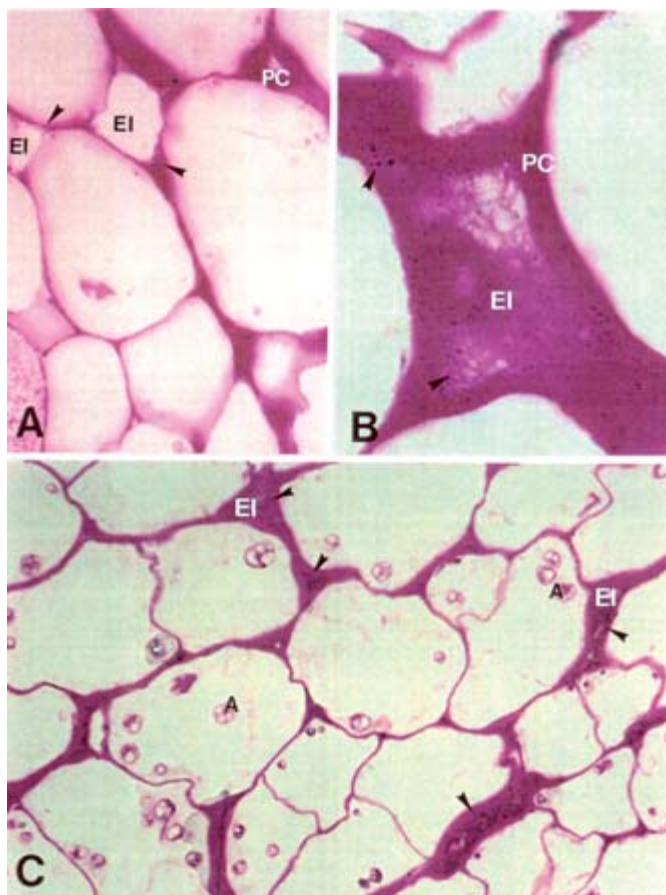


FIGURA 14. Localización inmunocitoquímica de glicoproteína con MAC 236 al microscopio óptico. **A**, Nódulos control. Espacio intercelular libre. $\times 380$. **B**, Espacio intercelular ocluido parcialmente por una matriz inmunomarcada. $\times 950$. **C**, Espacios intercelulares totalmente ocluidos en un nódulo tratado con nitrato potásico 20 mM durante cuatro días. $\times 380$. A, almidón; EI espacio intercelular; PC, pared celular.

La localización inmunocitoquímica fue mayor en el último caso, lo que parece indicar que la glicoproteína de los espacios intercelulares está relacionada íntimamente con la operación de la barrera, aumentando o disminuyendo su contenido y en consecuencia abriendo o cerrando el flujo de oxígeno a la zona infectada.

En condiciones de estrés (nitrato, oscuridad, salinidad, etc.) las glicoproteínas aumentan en los espacios intercelulares, cerrando la posibilidad al oxígeno de difundir a la zona infectada (Fernández Pascual y col., 1996). De este modo, la barrera es capaz de ajustar la resistencia a la difusión de O_2 de acuerdo a las condiciones ambientales de crecimiento de las plantas.

Los trabajos que nuestro grupo ha llevado a cabo para el estudio de la identificación y operación de la barrera de resistencia a la difusión de O_2 han sido realizados en colaboración con el Doctor Frank Minchin (Aberystwyth, País de Gales, U.K.). De los dos epitopos estudiados, MAC 236 y MAC 265, el primero parece estar relacionado con el desarrollo del nódulo y situaciones de estrés de la planta, de ahí su papel en el funcionamiento de la barrera de difusión de oxígeno, regulando su concentración en la zona infectada. Por el contrario, el epitopo MAC 265 apenas se encuentra localizado en la matriz intercelular y creemos que está principalmente asociado a los primeros estadios de la infección del *Bradyrhizobium* (de Lorenzo y col., 1998) y su concentración no cambia con la edad de la planta, como se observa en la Figura 15B.

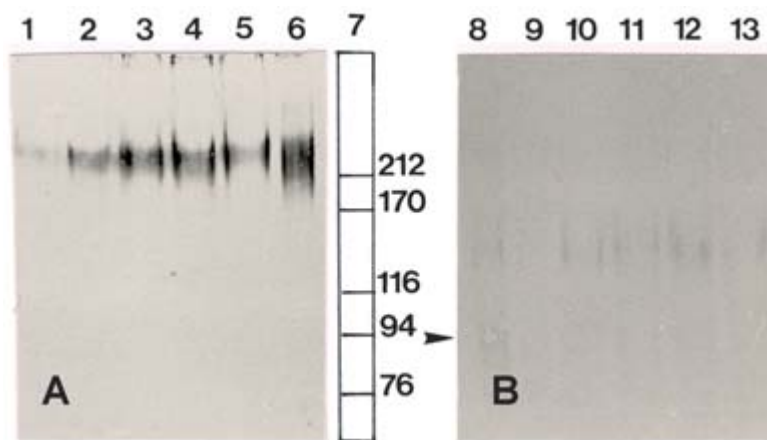


FIGURA 15. Inmunodetección de antígenos MAC 236 y MAC 265 en extractos de nódulo de altramuza después de SDS-PAGE y Western blot. **A**, Detección de MAC 236. 1-7 fracción soluble de nódulos de 13, 18, 22, 26, 29, 35 y 42 días después de la inoculación. 7, marcadores de peso molecular. **B**, Detección de MAC 265. Líneas de 8 a 13 como en **A**.

Así pues, en esta simbiosis las glicoproteínas parecen también tener un papel relevante en las primeras etapas de interacción entre los dos simbiosis, tal vez en la fase de reconocimiento junto a sustancias flavonoides específicas.

La aplicación de técnicas inmunocitoquímicas nos ha ayudado de modo eficaz a conocer la función de las glicoproteínas en los mecanismos de operación de la barrera de resistencia a la difusión de O_2 en condiciones normales y frente a estreses ambientales (de Lorenzo y col., 1993; Iannetta y col., 1993, Fernández-Pascual y col., 1996). Además nos ha permitido conocer la existencia de estructuras nodulares no descritas con anterioridad (de Lorenzo y col., 1993), que se encuentran adheridas a las paredes celulares que rodean los espacios intercelulares de la barrera morfológica, conteniendo también glicoproteínas y que pudieran actuar como reservorios de estas proteínas a lo largo del desarrollo del nódulo.

1.1.3.3. Expresión de genes implicados en la regulación de O₂

Siguiendo nuestros estudios sobre la identificación y operación de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, nuestro objetivo se centró en constatar si la limitación de oxígeno en el nódulo es la causa principal de la inhibición de la fijación de nitrógeno, lo que realizamos mediante la aplicación de diferentes concentraciones de oxígeno por debajo y por encima de la presión atmosférica: 1% y 40% de oxígeno (Guasch, 1998 y Guasch y col., 2001). Este estudio estructural fue complementado con la expresión de los genes relacionados con la difusión de O₂: *enod 2*, *leghemoglobina* y *nifH*, dado el desconocimiento de las bases moleculares de la barrera a la difusión de oxígeno.

Trabajos realizados por el Profesor T. Bisseling del Departamento de Genética Molecular de la Universidad de Wageningen, señalaban la posibilidad de que el gen *enod 2* podría ser responsable de la constitución morfológica de la barrera de resistencia, debido a su localización en el parénquima nodular y a la secuencia codificante de dicho gen. Por ello, el trabajo genético lo llevamos a cabo en colaboración con el Profesor Bisseling para conocer la expresión del gen *enod 2* en nódulos de lupino. La aplicación de técnicas de Northern Blot e Hibridación *in situ* con la sonda de un fragmento de *lenod 2* de *Lupinus luteus*, cedida por el Doctor Legocki de la Universidad de Poznan (Polonia), sirvieron para demostrar la influencia del oxígeno en la expresión del gen (Guasch, 1998).

Para la hibridación *in situ* los tejidos fueron previamente fijados en paraformaldehído-glutaraldehído e incluidos en Paraplast. Se obtuvieron secciones de 10 µm de grosor. Para la hibridación, la sonda fue marcada con digoxigenina y para la detección se aplicaron anticuerpos antidigoxigenina unidos a fosfatasa alcalina o bien sonda marcada radioactivamente.

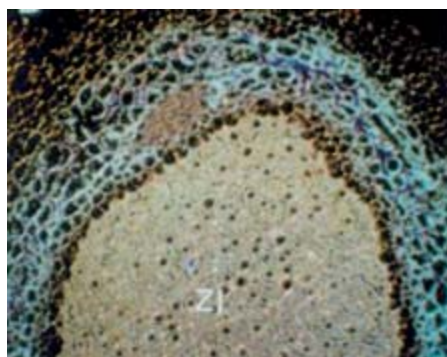


FIGURA 16. Hibridación *in situ* (RNA-RNA) con sonda de *lenod 2* marcada con S³⁵ y revelada con emulsión fotográfica. Nódulos incluidos en Paraplast. ZI, zona infectada.

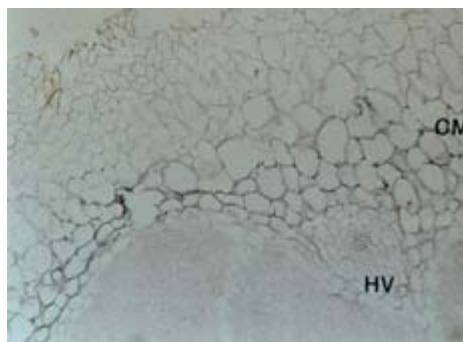


FIGURA 17. Hibridación *in situ* (RNA-RNA) con sonda de *lenod 2* marcada con digoxigenina y revelada con anticuerpos unidos a fosfatasa alcalina. Nódulos incluidos en Paraplast. CM, corteza media. HV, haz vascular.

Las Figuras 16 y 17 muestran la localización del gen *lenod 2* usando sonda radioactiva y digoxigenina respectivamente en una sección longitudinal del nódulo de lupino. Como puede observarse, la localización coincide con el parénquima o corteza media donde se sitúa la barrera de resistencia al O_2 . La localización es muy específica, no encontrándose en otras estructuras del nódulo y varía con la concentración de oxígeno aplicada. Estos resultados apuntan a que el gen *lenod 2* podría estar implicado en la formación de la barrera morfológica de resistencia a la difusión de O_2 (Guasch, 1998).

La expresión de *lenod 2* comienza a detectarse 13 días después de la inoculación, antes de la aparición de la nitrogenasa, por lo que puede considerarse como nodulina temprana. Con respecto a la expresión de genes implicados en la regulación de la difusión de O_2 , el notable incremento del contenido del mensajero del gen *enod 2* con la aplicación de 40% O_2 al sistema radicular durante tres días coincide con el aumento de la resistencia mínima, lo que parece confirmar su papel en la difusión de oxígeno a medio plazo, mientras que a más largo plazo los cambios bioquímicos y genéticos ceden el protagonismo a los estructurales. El mensajero de leghemoglobina desciende de forma apreciable a partir del tercer día lo que está en concordancia con el papel regulador de la misma en el bloqueo de la difusión facilitada. Mientras que la expresión de *nifH*, perteneciente al simbionte, no se ve alterada por los tratamientos aplicados. Esto demuestra la capacidad de adaptación de los nódulos de lupino a altas concentraciones de O_2 debido a la sucesión de modificaciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales producidas en los mecanismos de difusión de O_2 dentro del nódulo.

1.1.4. Localización de glicoproteínas durante el desarrollo del nódulo

Las diferencias electroforéticas encontradas entre los epítomos MAC 236 y MAC 265 en nódulos de lupino (apartado 1.1.3.2.), motivó un estudio detallado para conocer el papel de cada uno de ellos en la simbiosis. Su diferente comportamiento en los análisis electroforéticos y «Western blot» nos sugirió la posibilidad de su localización en diferentes compartimientos subcelulares. Podría incluso tratarse de una misma glicoproteína con diferente grado de glicosilación y con diferente función durante el desarrollo del nódulo.

Para ello continuamos el estudio de la distribución subcelular y variaciones cuantitativas de los epítomos MAC 236 y MAC 265 durante el desarrollo de *Lupinus albus* por medio de microscopía óptica y electrónica y por inmunocitoquímica (de Lorenzo y col., 1998).

Estos trabajos probaron que las técnicas inmunocitoquímicas son más sensibles que las técnicas de Western blot, detectando con mayor anticipación la aparición de ambos epítomos.

La inmunolocalización fue realizada en tres estadios diferentes del nódulo:
a) primordio nodular, inducido en la raíz por la infección con *Bradyrhizobium*

(13 días después de la infección); *b*) nódulo muy joven (18-20 días después de la infección), al comienzo de la fijación de nitrógeno, y *c*) nódulo maduro (35 días después de la inoculación).

Ambos epítomos fueron localizados en el primordio nodular (Figura 18 A). El epítomo predominante fue el MAC 265, que también fue localizado en la rizosfera, en la proximidad de los pelos radiculares (Figura 18 C) y en los espacios intercelulares de las células corticales de la raíz (Figura 18 B), pero especialmente en las proximidades del primordio nodular (Figura 18 E y F). Estos resultados fueron confirmados al microscopio electrónico (Figura 19) observando abundantes vesículas (Figura 19 A-C) mostrando inmunolocalización en las proximidades del primordio nodular, y cisternas de aparato de Golgi inmunomarcadas. En estos componentes del Golgi se podría producir la glicosilación de las glicoproteínas en etapas muy preliminares (Figura 19 D-I).

En el nódulo maduro (Figura 20) ambos epítomos fueron localizados en la matriz de los espacios intercelulares de la corteza media, que constituye la barrera de resistencia a la difusión de O_2 . La observación por microscopía electrónica permitió ver algunas diferencias entre ambos epitopos. Así el MAC 265 se encontró en vesículas intracelulares en el citoplasma (Figura 21 A, B), mientras que el MAC 236 se encuentra en unas estructuras lobulares anejas a la pared celular de los espacios intercelulares que pueden actuar como depósitos de glicoproteínas a lo largo del desarrollo del nódulo (Figura 21 D).

De los resultados obtenidos podemos concluir que ambos epitopos tienen diferentes funciones en el nódulo de lupino. El epítomo MAC 265 está asociado principalmente a los primeros estadios del establecimiento del nódulo en el reconocimiento entre la bacteria y la planta, siendo sintetizado en vesículas y transportado intracelularmente a través de las paredes celulares, antes de ser exportado a los espacios intercelulares. Por el contrario, el epitopo MAC 236 aumenta con el desarrollo del nódulo paralelamente a la fijación de nitrógeno. Se acumula principalmente en la matriz de los espacios intercelulares de la corteza media, regulando la operación de la barrera de resistencia y por ello la difusión de oxígeno a la zona infectada. Su presencia es esencial para el mantenimiento de la actividad fijadora de nitrógeno, protegiendo del oxígeno al enzima nitrogenasa. Las estructuras globulares con contenido en glicoproteínas, no descritas con anterioridad, pueden considerarse como reservorios de glicoproteínas que la planta utilizará durante su desarrollo o en condiciones de estreses bióticos o abióticos.

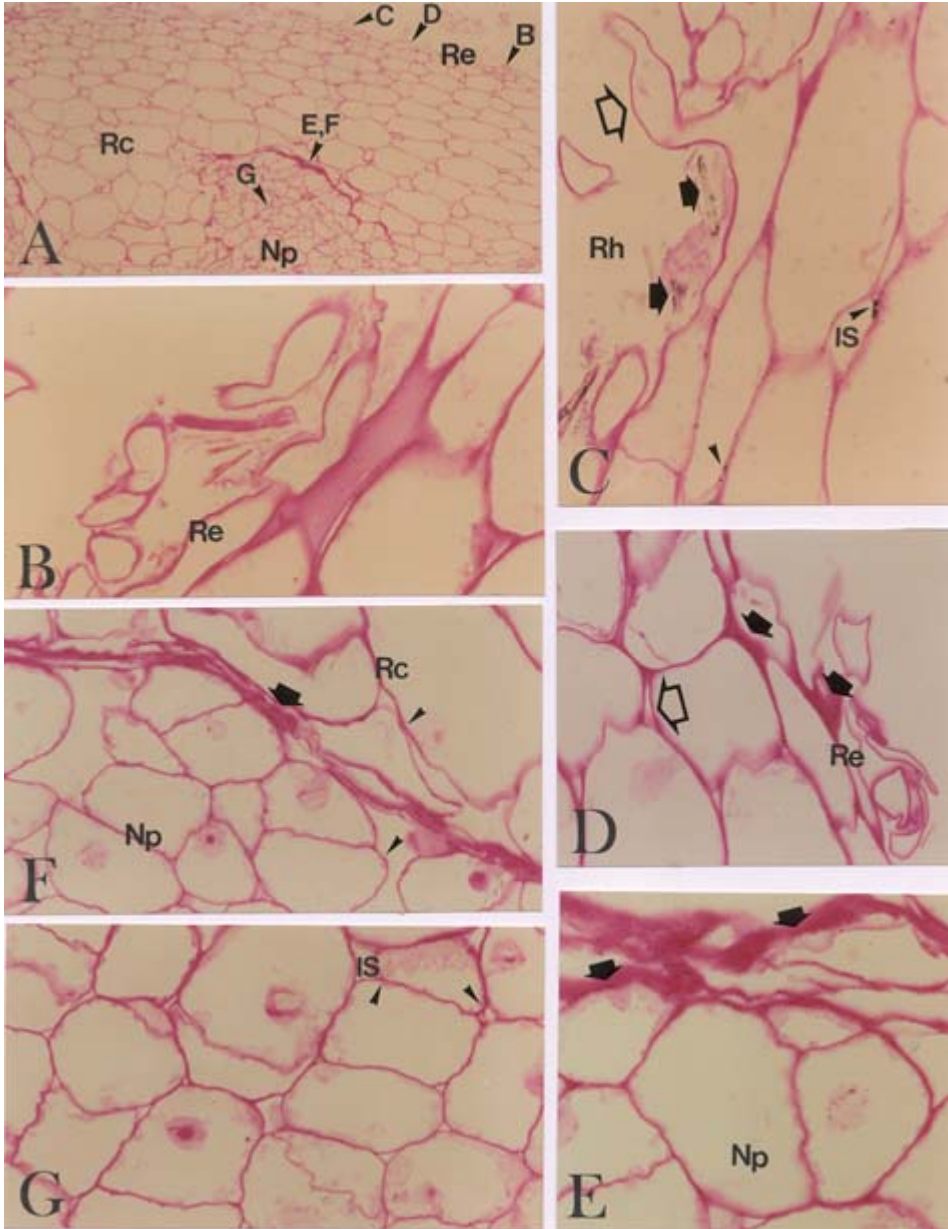


FIGURA 18. *Etapas iniciales en la formación del nódulo de Lupinus 13 días después de la inoculación de las semillas, mostrando inmunolocalización y «silver enhancement» de las glicoproteínas MAC 236 y MAC 265 (flechas). A, x 75. B, x 750 y C, x 480. D, y E, x 750. F, x 480. IS, espacio intercelular; Np, primordio nodular; Rc, corteza radical; Re, epidermis radicular; Rh, rizosfera.*

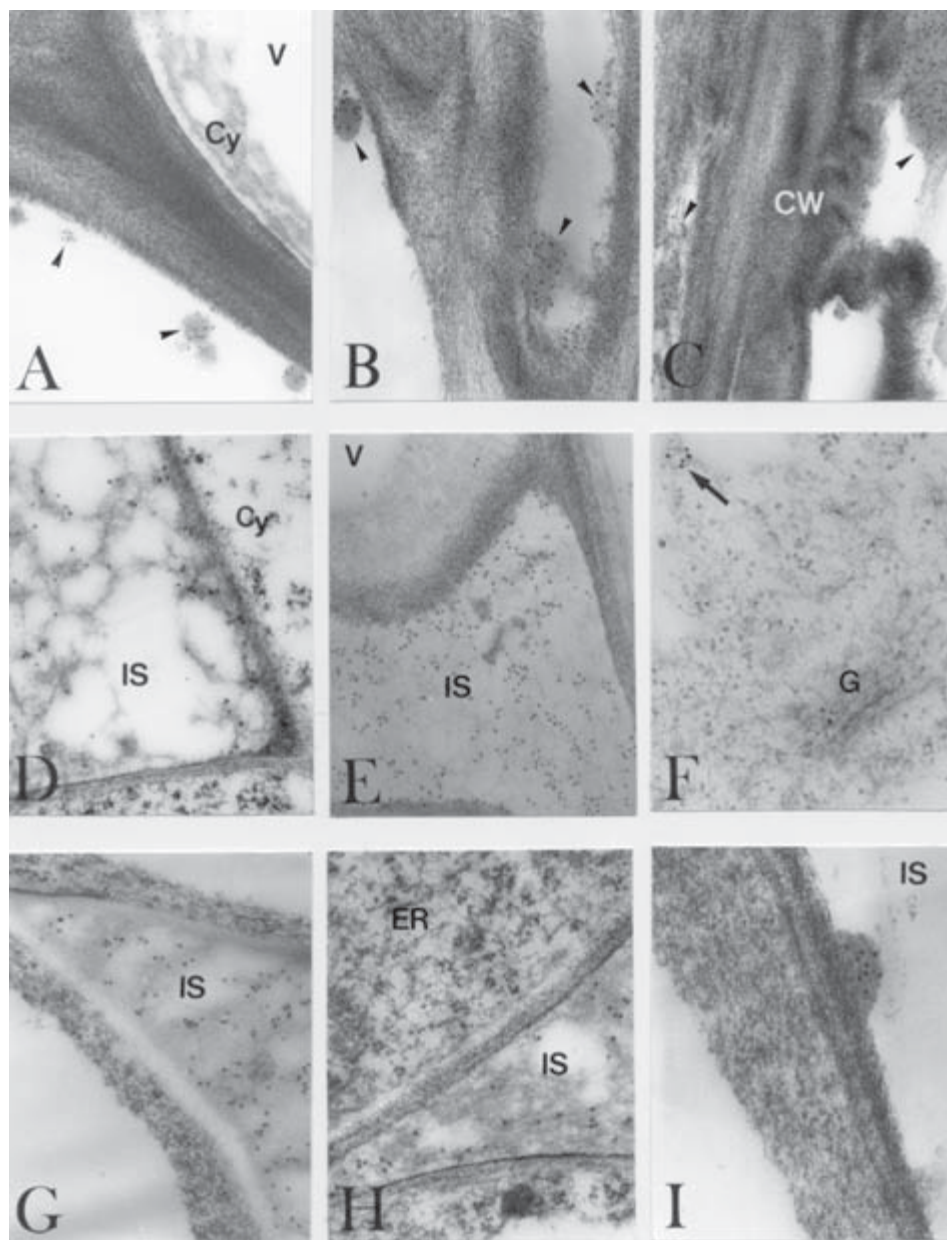


FIGURA 19. Microfotografía electrónica mostrando inmunolocalización de MAC 236 (D, E, G) y MAC 265 (A-C, F, H, I) en raíces y primordios de *Lupinus*. A-F, Nódulos jóvenes (19 días después de la inoculación). G-I, Nódulos maduros. Cy, citoplasma; CW, pared celular; G, aparato de Golgi; IS, espacio intercelular; ER, retículo endoplásmico; V, vacuola. A, D x 41500; B, x 16800; C, x 32600; E, H, x 50700; F, x 76700; I, x 78500.

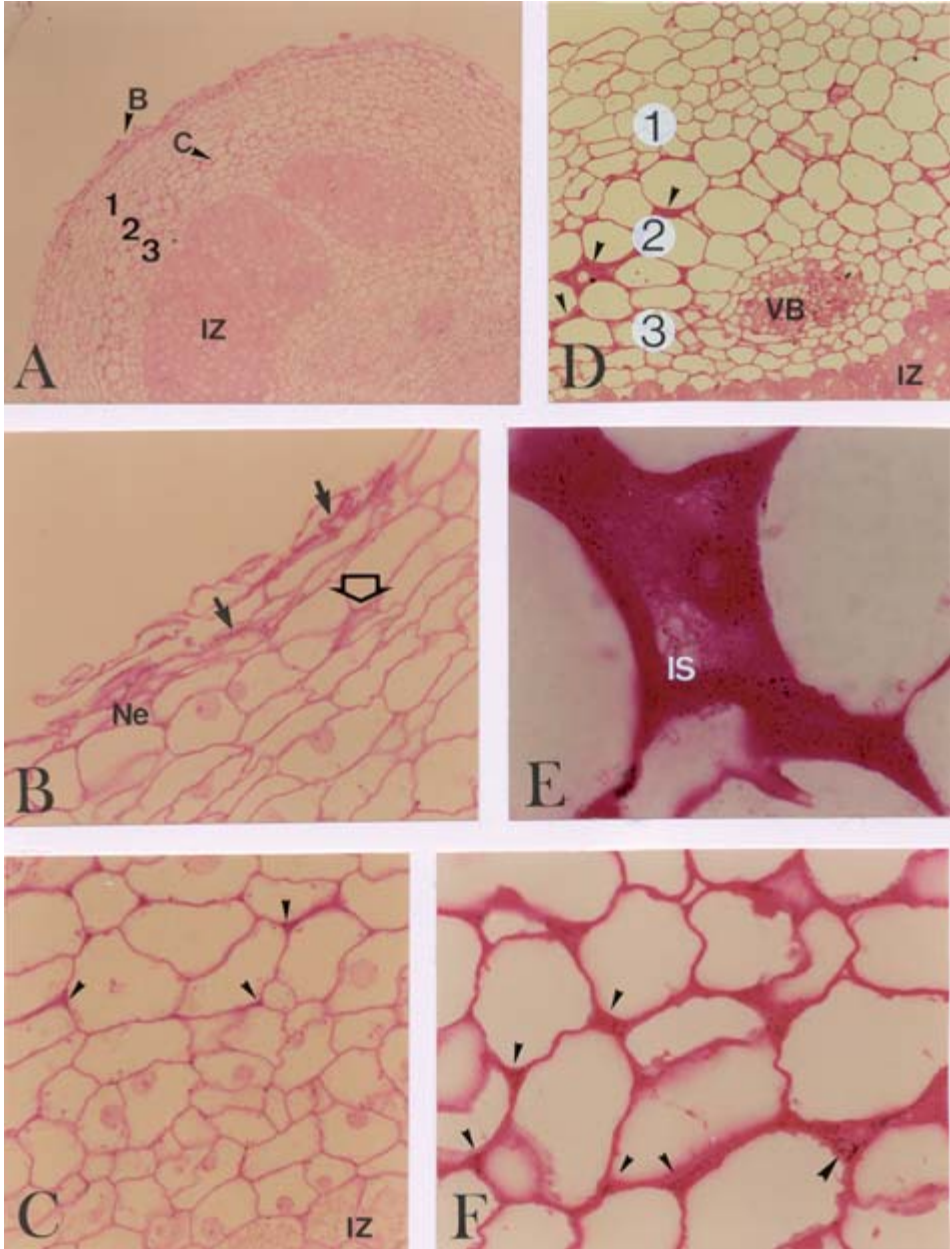


FIGURA 20. Inmunolocalización de epitopos MAC 236 y MAC 265 en raíces de altramuze 18 días después de la inoculación (A-C) y nódulos maduros (D-F). IS, espacio intercelular; IZ, zona infectada; Ne, epidermis del nódulo; VB, haz vascular. A, $\times 75$. B y C, $\times 750$. D, $\times 480$. E, $\times 1000$; F, $\times 750$.

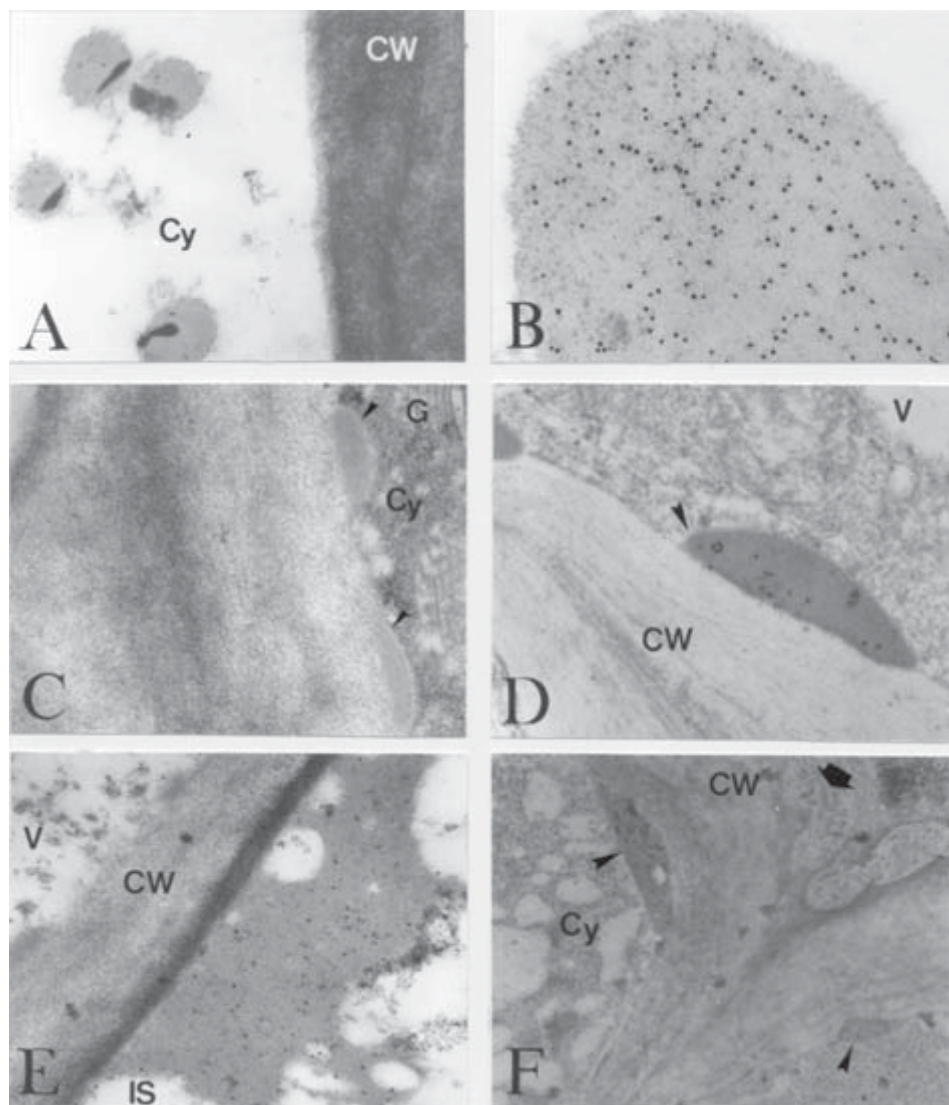


FIGURA 21. Microfotografía electrónica mostrando inmunolocalización de MAC 236 (D, F) y MAC 265 (A-C, E) en nódulos maduros. Cy, citoplasma; CW, pared celular; G, aparato de Golgi; IS, espacio intercelular; V, vacuola. A, D, E, $\times 41500$; B, $\times 66700$; C, $\times 50700$; F, $\times 8700$.

1.1.5. Activación de MAPKs en la infección

La cascada de las MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), tanto en mamíferos como en plantas, es una de las vías más importantes mediante la cual los estímulos extracelulares son transducidos en una respuesta intracelular. Las MAPKs están implicadas en la regulación del ciclo celular, en la acción hormonal y en la respuesta de la planta a diversos estreses y patógenos.

MAPKs pueden mediar en los procesos de infección por rizobios. La inoculación de *L. albus* con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) activa transitoriamente SIMK (Salt stress-inducible MAPK) y SAMK (stress-activated MAPK). La inoculación de raíces con bacterias muertas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) o con *Sinorhizobium meliloti*, bacteria incapaz de nodular *Lupinus*, no tiene efecto en la activación de SIMK y SAMK (Fernández-Pascual y col., 2006).

Estos datos indican que la activación de estas enzimas es una respuesta específica de las células de la leguminosa a la bacteria potencialmente simbiótica, y por tanto puede conducir a una interacción simbiótica positiva. La utilización de inhibidores específicos de MAPKs produce un retraso en la nodulación, lo que sugiere que estas quinasas intervienen en procesos tempranos de la infección.

1.1.6. Presencia de aldehído oxidasa y síntesis de AIA en el meristemo nodular

Las fitohormonas, como auxinas, actúan en la organogénesis de los nódulos de leguminosas, aunque su papel no está totalmente determinado. En las etapas más tempranas de la nodulación, se han descrito elevadas concentraciones de auxina en las zonas de la raíz donde se inicia la formación de los nódulos. Se ha propuesto la existencia de un bloqueo transitorio del transporte polar de auxina en estas zonas, y una restauración posterior del transporte de la hormona a la raíz y al nódulo formado. Sin embargo, recientemente hemos demostrado, por primera vez en nódulos la presencia de un enzima de la síntesis de AIA, (aldehído oxidasa). Por tanto los nódulos poseen la potencial capacidad de síntesis de esta hormona (Fedorova y col., 2005).

El enzima aldehído oxidasa (AO) cataliza la oxidación de aldehídos y compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno en animales y microorganismos. En plantas, interviene en la última etapa de la síntesis del ácido abscísico (ABA) y del ácido indol acético (AIA), vía indol-3-pirúvico.

Los nódulos de *L. albus*, inducidos por cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), poseen tres isoenzimas de AO. Sin embargo, los nódulos Fix⁻, de crecimiento restringido y senescencia prematura, inducidos por una cepa de *Mesorhizobium loti*, no parecen poseer AOs activas. Mediante el inmunomarcado de los tejidos con anticuerpos anti-AOs de *Arabidopsis thaliana*, pero que reconocen AOs nodulares, se estudió la localización del enzima, por microscopia elec-

trónica de transmisión, de fluorescencia y microscopía láser confocal. La proteína que es citoplasmática, se localiza preferentemente en la zona meristemática lateral de los nódulos de altramuza, constituida por células no infectadas e infectadas en división (Figura 22 A-C). El análisis de expresión de AO mediante RT-PCR demostró que la expresión más alta se produce en el primordio nodular y la más baja en nódulos Fix⁻. Los estudios de hibridación *in situ* mostraron un patrón de expresión altamente consistente con la distribución de la proteína. Un estudio paralelo en nódulos de *Medicago truncatula* confirmó la presencia del enzima (gen y proteína) en la zona meristemática nodular y de infección. Tanto en el nódulo de altramuza como en el de *M. truncatula*, AIA fue inmunolocalizado siguiendo un patrón semejante al encontrado para AO (Fedorova *et al.*, 2005). Por el contrario, el inmunomarcado de ABA en los nódulos reveló que los niveles de esta hormona eran bajos y homogéneos en todas las zonas del nódulo (Figura 22 D).

Estos resultados indican la capacidad de síntesis local de AIA en la zona meristemática de los nódulos de leguminosas, así como la posible implicación de AO en la organogénesis nodular y en la autorregulación del crecimiento y el desarrollo de los nódulos.

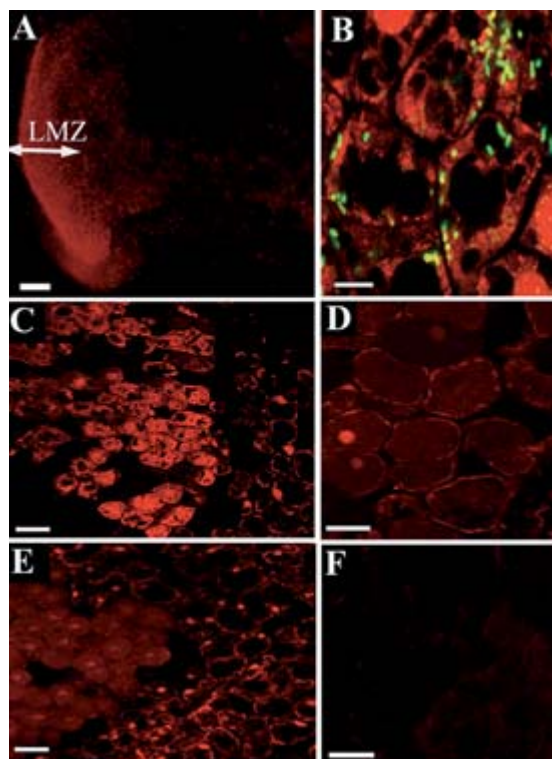


FIGURA 22. Localización de aldehído oxidasa (AO) y ácido abscísico (ABA) en nódulos de *Lupinus albus*. **A**, microfotografía de fluorescencia mostrando localización de AO en la zona meristemática lateral (LMZ) de nódulos, 16 días después de la inoculación. Barra: 100 μ m. **B**, microfotografía de láser confocal en que se aprecia fuerte localización de AO en el citoplasma de células infectadas de nódulo, 16 días después de la inoculación. Bacterias teñidas con Sytox, en verde. Barra: 10 μ m. **C**, microfotografía de confocal mostrando AO en varias capas de células infectadas. Barra: 50 μ m. **D**, inmunolocalización de (ABA) en nódulos, 16 días después de la inoculación. Barra: 16 μ m. **E**, Escaso inmunomarcado de AO en nódulos de 30 días. Imagen láser confocal. Barra: 50 μ m. **F**, Sección control, sin anticuerpo primario. Barra: 16 μ m.

1.1.7. *Senescencia nodular*

Como es sabido la senescencia vegetal y animal está íntimamente relacionada con el contenido de sustancias oxidantes en los tejidos, los llamados radicales libres. Entre ellos, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH) son los más tóxicos y pueden conducir a la muerte celular. Pero las células disponen también de sustancias antioxidantes para contrarrestar a los radicales libres de tipo enzimático: superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y enzimas del ciclo ascorbato-glutamato, como la ascorbato peroxidasa y la glutamato reductasa. También las células contienen vitaminas antioxidantes, vitamina C y vitamina E que controlan la producción de radicales libres. El avance de la senescencia celular dependerá del balance entre sistemas oxidantes y antioxidantes en los tejidos.

Los nódulos de leguminosas constituyen un ambiente favorable para la producción de radicales libres, debido a la alta tasa de respiración de los bacteroides y mitocondrias, tendencia a la autooxidación de la leghemoglobina, abundancia de Fe catalítico libre, etc. Son escasos los estudios relacionando alteraciones estructurales y citoquímicas de los nódulos de leguminosas con el metabolismo oxidativo. En los nódulos, el hierro catalítico libre en el citosol de las células infectadas, puede desencadenar estados de senescencia prematura, ya que actúa en la formación del radical hidroxilo, causando la desintegración de los orgánulos subcelulares y bacteroides en las células infectadas. Aunque el hierro en su mayoría está en forma de leghemoglobina, procesos de oxidación pueden acarrear la presencia de hierro libre en el citosol del nódulo (Puppo y col., 2005).

Nuestro grupo de investigación viene realizando estudios de senescencia en nódulos de leguminosas a través de proyectos europeos, que coordina el Doctor Alain Puppo de la Universidad de Niza.

La influencia del metabolismo oxidativo en la senescencia nodular ha sido nuestro principal objetivo (Hernández-Jiménez, 1998). La senescencia fue inducida por oscuridad y se comparó la senescencia vegetal natural, como consecuencia de la edad de la planta, con la senescencia inducida. Nuestro objetivo se centró en conocer las alteraciones estructurales, observadas por microscopía óptica y electrónica durante el desarrollo del nódulo, comparándolas con las obtenidas sometiendo las plantas a oscuridad. El trabajo incluyó también estudios enzimáticos relacionados con el estrés oxidativo, como catalasa, superoxidodismutasa, isoenzimas de peroxidasas y enzimas del ciclo ascorbato-glutation. La determinación de hierro catalítico y el daño oxidativo a macromoléculas también fueron objeto de estudio.

A continuación mostramos las alteraciones estructurales asociadas al desarrollo de los nódulos durante el envejecimiento, la localización del enzima catalasa en peroxisomas y la localización de fitoferritina en plastidios:

1.1.7.1. Alteraciones estructurales en la senescencia del nódulo

Los resultados estructurales fueron similares en la senescencia natural (Figura 23) que en la inducida por oscuridad (Figura 24). En estadios tempranos de senescencia se observó la degradación de los bacteroides en el interior de los simbiosomas (Figura 23) y el aumento de densidad electrónica en el citosol, así como la presencia de grandes espacios intercelulares ocupados por bacterias (Figura 25). En estadios más avanzados de senescencia se apreciaron roturas de las membranas peribacteroidales y la degradación del citosol de la célula vegetal (Figura 24 C, D) (Hernández-Jiménez y col., 2002).

En senescencia natural (Lucas y col., 1998) y en senescencia inducida por oscuridad (Hernández-Jiménez y col., 2002) los plastidios fueron los últimos orgánulos destruidos (Figuras 23 y 24). Este hecho nos hizo proponer, por primera vez, que los plastidios juegan un papel importante en la senescencia, y se debería prestar más atención a su función en el desarrollo nodular (Lucas y col., 1998).

Además, se describió por primera vez que mientras que las células de la zona infectada muestran síntomas de avanzada senescencia, las células de la corteza no presentaban daños estructurales visibles, lo que apunta a la preservación estructural de la corteza especialmente durante la senescencia del nódulo (Lucas y col., 1998).

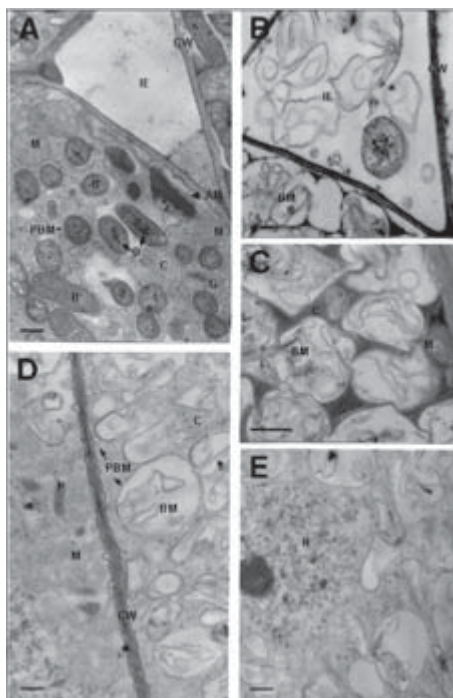


FIGURA 23. Microfotografías electrónicas mostrando el efecto de la edad en las células infectadas del nódulo de altramuza. **A**, Nódulos de 5 semanas con simbiosomas y citosol normales. **B**, Bacterias no afectadas en los espacios intercelulares de nódulos de 9 semanas. **C**, Células infectadas en nódulos de 9 semanas mostrando simbiosomas deteriorados y citosol denso a los electrones. **D**, Membranas peribacteroidales y vesículas citosólicas en células infectadas de nódulos de 9 semanas. **E**, Nódulos de 12 semanas mostrando ruptura de orgánulos y citosol. Los amiloplastos son todavía visibles. Las flechas indican restos de las membranas celulares. AM, amiloplasto; B, bacteroide; BA, bacteria; BM, membrana del bacteroide; C, citoplasma; CW, pared celular; D, DNA; IE, espacio intercelular; M, mitocondria; PBM, membrana peribacteroidal. Barra: 0,5 μ m.

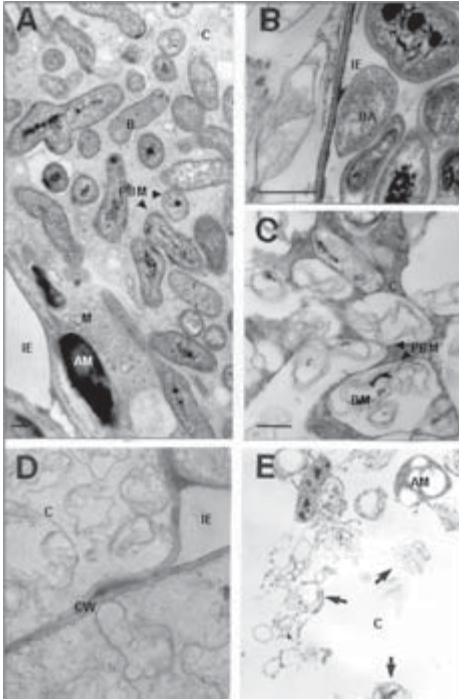


FIGURA 24. Microfotografías electrónicas mostrando el efecto de la oscuridad en las células infectadas del nódulo de altramu. **A**, Células infectadas control. **B**, Células infectadas mostrando simbiosomas alterados y bacterias no afectadas en los espacios intercelulares. **C**, Células infectadas mostrando simbiosomas y citoplasma alterados. **D**, Células infectadas muy deterioradas mostrando ruptura de los orgánulos celulares. **E**, Alteraciones en el núcleo de las células infectadas. AM, amilooplasto; B, bacteroide; BA, bacteria; BM, membrana del bacteroide; C, citoplasma; CW, pared celular; D, DNA; G, aparato de Golgi; IE, espacio intercelular; M, mitocondria; N, núcleo; P, plastidio; PBM, membrana peribacteroidal. Barra: 0,5 μm .

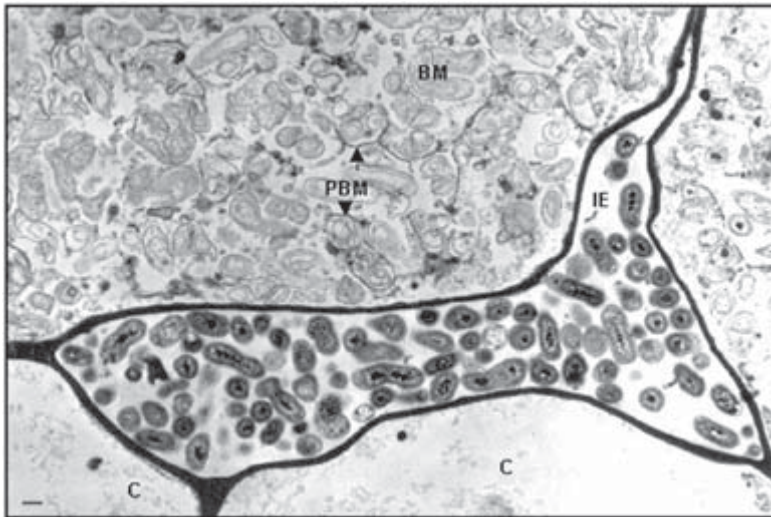


FIGURA 25. Microfotografía electrónica mostrando el efecto de 7 días de oscuridad en la zona infectada. Los simbiosomas y citosol aparecen muy afectados. El espacio intercelular, sin embargo, muestra bacterias aparentemente no afectadas. BM, membrana del bacteroide; C, citoplasma; IE, espacio intercelular; PBM, membrana peribacteroidal. Barra: 0,5 μm .

1.1.7.2. Ferritina: Localización *in situ*

La ferritina es una proteína que almacena hierro y ha sido localizada en los plastidios (Theil, 1987) aunque parece ser sintetizada en el citoplasma y mediante un péptido de tránsito transportada a los plastidios.

Debido a la síntesis de leghemoglobina en el citoplasma de las células infectadas del nódulo y la síntesis de citocromos y de la nitrogenasa (cofactor Fe Mo Co) en los bacteroides, la concentración de hierro en los nódulos tiene gran importancia, por sus implicaciones en procesos de oxidación. Aunque trabajos previos (Ko y col., 1985) relacionaban la leghemoglobina con la ferritina, observando una relación inversa entre ambas proteínas en nódulos de soja atacados por nemátodos, no existían referencias bibliográficas relacionando ferritina y senescencia nodular, y además la localización *in situ* de la ferritina en nódulos no había sido llevada a cabo por ningún grupo de investigación.

Realizamos la localización de ferritina, por técnicas inmunocitoquímicas, en plantas de lupino, soja y alfalfa durante el envejecimiento del nódulo (Lucas y col., 1998). La mayor localización fue encontrada en plastidios y amiloplastos de las células infectadas y no infectadas de las tres leguminosas estudiadas (Figuras 26 y 27). Se observó disminución de la localización en la zona infectada de nódulos senescentes de estas leguminosas (Figura 26).

En la corteza de los nódulos de lupino y soja, la ferritina aumentó durante el desarrollo y su localización se situó en los plastidios, principalmente sobre estructuras cristalinas (Figura 26). El hecho de que la inmunolocalización disminuya con la edad del nódulo en la zona infectada, sugiere una relación inversa entre el contenido de ferritina de las células infectadas y el envejecimiento del nódulo. En estos nódulos la capacidad de la ferritina de secuestrar el hierro libre disminuye, lo que puede originar la aparición de radicales libres durante la senescencia (Becana y Klucas, 1992).

La aplicación de las técnicas de inmunocitoquímica ha mostrado diferencias de localización de ferritina en nódulos senescentes, entre las células de la zona infectada y las de la corteza del nódulo, que no habrían podido ser observadas únicamente por técnicas bioquímicas.

Este trabajo evidencia, una vez más, la importancia de las técnicas inmunocitoquímicas para el estudio temporal y espacial de los componentes del nódulo a lo largo del desarrollo, en combinación con las técnicas de inmunoblotting. El contenido total de ferritina se incrementó considerablemente con la edad del nódulo de lupino de acuerdo a los resultados de inmunoblott (Figura 28), pero mediante inmunolocalización *in situ* pudimos comprobar que este aumento de ferritina correspondía exclusivamente a las células de la corteza ya que la proteína disminuía en la zona infectada del nódulo.

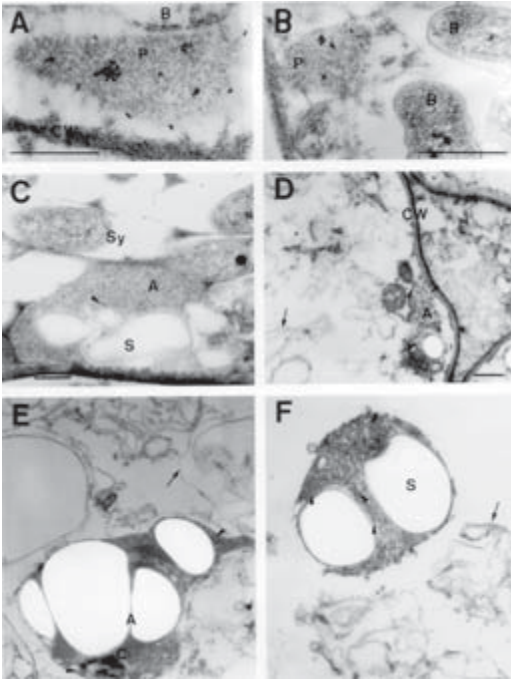


FIGURA 26. Inmunolocalización con oro coloidal de ferritina en células infectadas de nódulos de altramuz. **A**, Plastidio de nódulo de 3 semanas mostrando abundantes partículas de oro coloidal. **B**, Inmunomarcado de ferritina en plastidios y bacteroides en nódulos jóvenes (3 semanas). **C**, Disminución de inmunomarcado en un amiloplasto de nódulo maduro (5 semanas). **D**, Células de un nódulo viejo (7 semanas) con síntomas de senescencia, mostrando inmunomarcado en amiloplasto. **E** y **F**, Amiloplasto de nódulos senescentes (12 semanas) mostrando partículas de oro en estroma y cristales de ferritina. A, amiloplasto; B, bacteroide; C, estructuras cristalinas; CW, pared celular; P, plastidio; S, almidón; Sy, simbiosoma. Las flechas indican membranas de los simbiosomas destruidos y las puntas de flechas indican inmunomarcado. Barra: 0,5 μ m.

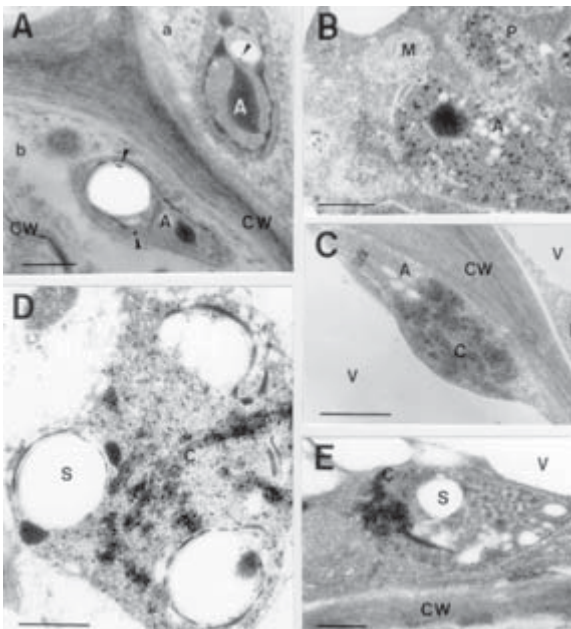


FIGURA 27. Inmunolocalización con oro coloidal de ferritina en células de la corteza de nódulos de altramuz. **A**, Amiloplastos en las células de la zona 2 (a) y zona 3 (b) de nódulos de 3 semanas mostrando débil inmunomarcado. **B**, Célula de la zona 2 de un nódulo de 5 semanas. Se observan abundantes partículas de oro en los estromas de plastidios y amiloplastos. **C**, Amiloplasto de la zona 3 de un nódulo viejo (7 semanas) conteniendo estructuras cristalinas de ferritina inmunomarcadas. **D**, Amiloplasto en células de la zona 1 de un nódulo senescente (12 semanas) mostrando abundantes partículas de oro en el empaquetamiento cristalino de ferritina. **E**, Amiloplasto, con estructuras cristalinas claramente inmunomarcadas, procedente de la zona 3 de un nódulo senescente (12 semanas). A, amiloplasto; C, estructuras cristalinas; CW, pared celular; M, mitocondria; P, plastidio; S, almidón; V, vacuola. Barra: 0,5 μ m.

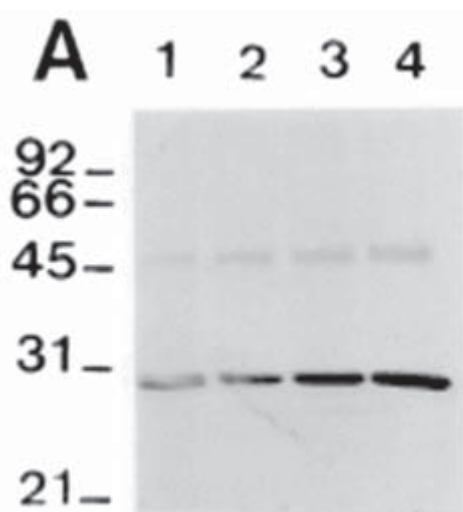


FIGURA 28. *Inmunodetección de ferritina en extractos de nódulos de altramuz después de SDS-PAGE y Western blot. 1-4: Extractos de nódulos de 3, 5, 9 y 12 semanas.*

1.1.7.3. Localización de catalasa en nódulos de lupino

La catalasa (EC.1.11.1.6) es un enzima que tiene un papel importante en el control de la senescencia por su influencia sobre el peróxido de hidrógeno. Este enzima hidroliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) procedente de la dismutación del radical superóxido (O_2^-) por la superóxido dismutasa. Su localización más común tiene lugar en microbodies especializados, llamados peroxisomas, siendo ampliamente distribuidos en el mesofilo de las hojas junto a otros orgánulos subcelulares cloroplastos, mitocondrias, etc. La senescencia en hojas conlleva una proliferación de peroxisomas (de Felipe y col., 1988).

Nuestro laboratorio ha estudiado la existencia de peroxisomas en nódulos de lupino para conocer su implicación en la senescencia del nódulo por el contenido de catalasa (enzima antioxidante) de estos organulos subcelulares. Su localización la llevamos a cabo por las técnicas de diamino bencidina (DAB) y tetróxido de osmio, que permiten estudiar la localización al microscopio óptico y electrónico (Müeller and Beckman, 1978).

La presencia de peroxisomas fue observada en las células infectadas de nódulos de lupino (Figura 29). Comparando la localización de catalasa en estos microbodies en plantas crecidas en condiciones normales y crecidas con nitrato, observamos alteración de los peroxisomas en estas últimas, como ruptura de la membrana simple de los peroxisomas y disminución del contenido de catalasa (Figura 30). En la senescencia natural, la actividad catalasa disminuye progresivamente, siendo del 80%, en nódulos de 9 semanas (de Lorenzo y col., 1990).

También la actividad catalasa disminuyó un 20% en nódulos sometidos a 7 días de oscuridad (Hernández-Jiménez, 1998).

La localización de catalasa, no sólo nos ha permitido la visualización morfológica de los peroxisomas, difíciles de identificar en el citosol del nódulo de altramuz, sino también nos ha permitido conocer su funcionamiento por las variaciones del contenido enzimático de catalasa, en condiciones normales y estrés de la planta.

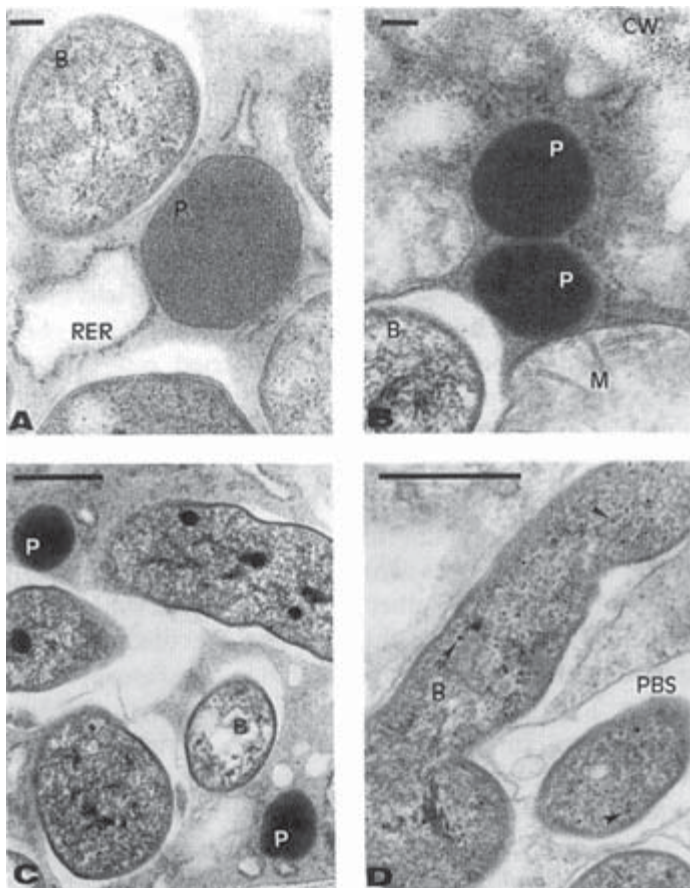


FIGURA 29. Microfotografías electrónicas de nódulos de plantas de *Lupinus albus* crecidas sin nitrato (controles). **A**, Célula infectada de un nódulo de 45 días. La membrana del peroxisoma puede ser fácilmente observada. El retículo endoplásmico rugoso está estrechamente asociado al peroxisoma. Barra: 0,1 μm . **B**, Célula infectada de un nódulo de 50 días después de llevar a cabo al técnica DAB. Los peroxisomas muestran un intenso oscurecimiento. Barra: 0,1 μm . **C**, Célula infectada de un nódulo de 50 días mostrando marcaje DAB en peroxisomas y bacteroides. Barra: 0,5 μm . **D**, Célula infectada de un nódulo de 50 días. Los bacteroides muestran un pequeño precipitado osmiofílico (flechas) que podrían indicar actividad catalasa. Barra: 0,5 μm . B, bacteroide; CW, pared celular; M, mitocondria; P, peroxisoma; PBS, espacio peribacteroidal; RER, retículo endoplásmico rugoso.

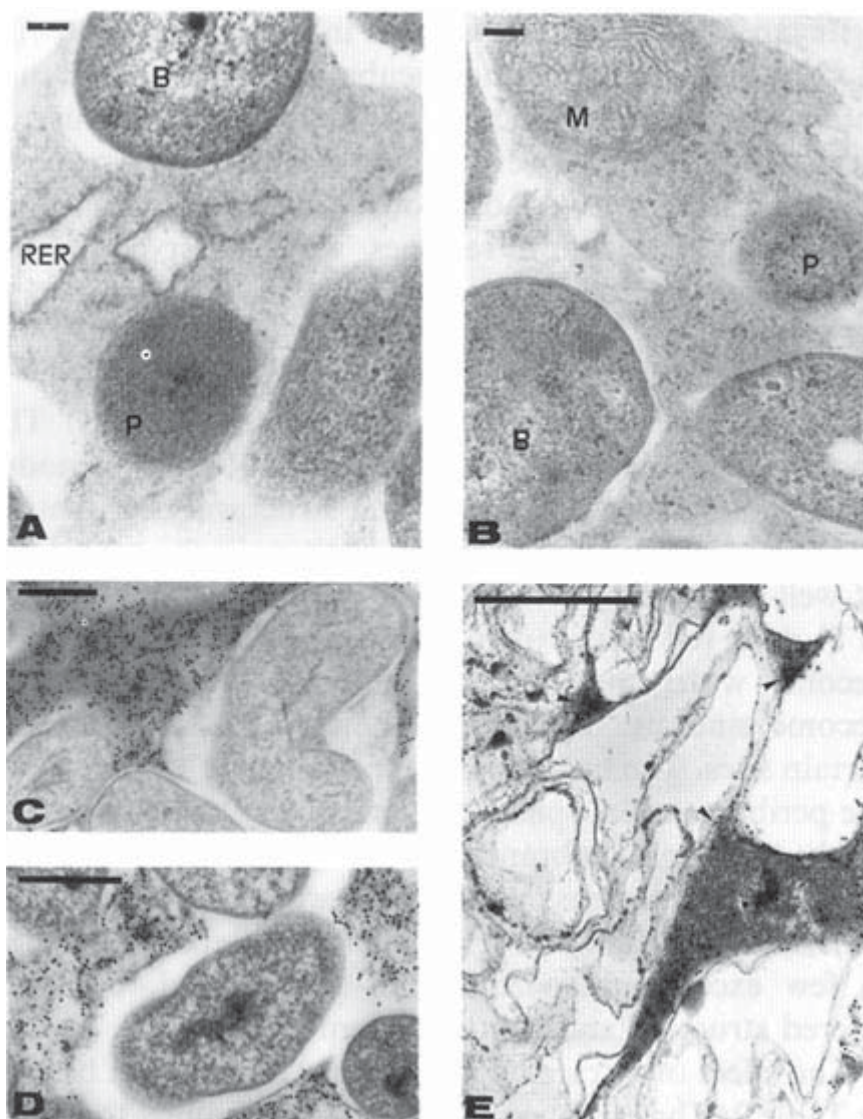


FIGURA 30. Efecto del nitrato (20 mol m^{-3}) en la ultraestructura del peroxisoma, actividad catalasa, y localización de leghemoglobina en nódulos de *Lupinus albus*. **A**, Microfotografía electrónica de una célula infectada de nódulo de 45 días después de emplear la técnica DAB. La planta fue expuesta a nitrato durante 5 días. La membrana del peroxisomas aparece interrumpida pero la forma del orgánulo es regular. El oscurecimiento no es tan intenso como en las plantas control, y está situado en la zona central. Barra: $0,1 \mu\text{m}$. **B**, Célula infectada de un nódulo de 50 días después de 10 días de tratamiento. La reacción en peroxisomas es muy ligera y la membrana de los peroxisomas no es visible. Barra: $0,1 \mu\text{m}$. **C**, Localización inmunocitoquímica de leghemoglobina en nódulo de 50 días de plantas control. Barra: $0,5 \mu\text{m}$. **D** y **E**, Localización inmunocitoquímica de leghemoglobina en nódulo de 50 días después de 10 días de tratamiento. Barra: $0,5 \mu\text{m}$. B, bacteroide; M, mitocondria; P, peroxisoma; RER, retículo endoplásmico rugoso.

1.1.8. *Presencia de una actividad óxido nítrico sintasa en raíces y nódulos de Lupinus albus*

El óxido nítrico, un gas que actúa como segundo mensajero, juega un papel controlador en biología, debido al efecto regulador que ejerce sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular.

La óxido nítrico sintasa (NOS EC 1.14.23), enzima ampliamente estudiada en mamíferos, produce óxido nítrico y citrulina a partir del aminoácido L-arginina. El óxido nítrico (NO) juega un importante papel en la fisiología animal, actuando bien como regulador o como citotóxico, y ese papel depende del tipo y origen de óxido nítrico sintasa de las células. En mamíferos existen por los menos dos tipos de óxido nítrico sintasas, las constitutivas (cNOS), implicadas en los mecanismos de transducción de señales, y las inducidas (iNOS) por endotoxinas y lipopolisacaridos bacterianos que pueden actuar como agentes citotáticos o citotóxicos.

Entre los resultados obtenidos como consecuencia de la aplicación de nitratos a plantas noduladas de lupino se encontró una alteración en el contenido de aminoácidos del nódulo (Lang, Tesis Doctoral, 1990). Llamó nuestra atención la disminución de asparragina y el incremento progresivo de arginina por la aplicación de nitrato, preguntándonos si esa arginina podría ser el sustrato para la producción de NO mediante la óxido nítrico sintasa, por un mecanismo similar al descrito en mamíferos.

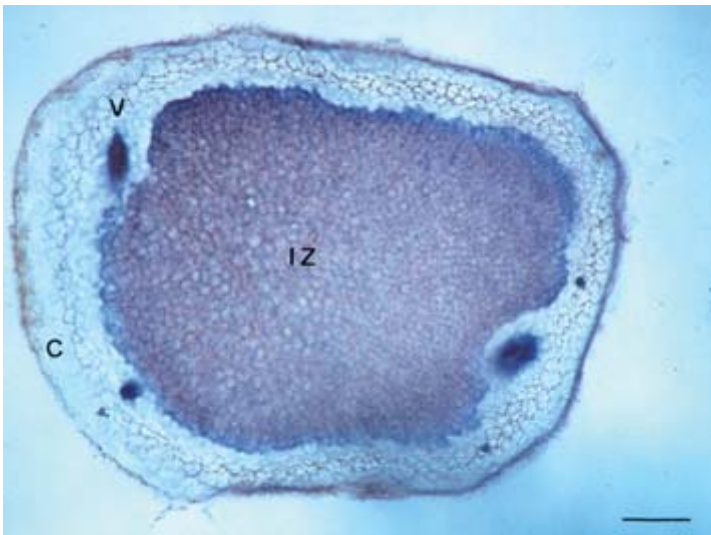


FIGURA 31. Co-localización histoquímica de NOS y NADPH-Diaforasa en nódulos de lupino. Vista de un corte transversal mostrando tinción con NBT específica en zona infectada y haces vasculares. C, corteza; IZ, zona infectada; V, haces vasculares. Barra 250 μ m.

El hecho de que los lipopolisacáridos (LPs) de bacterias sean capaces de inducir actividad óxido nítrico sintasa en células animales (Moncada y col., 1991) podría ser de especial relevancia en las leguminosas, ya que los LPS de las paredes del *Rhizobium* son esenciales en el establecimiento de la simbiosis. El NO es un radical libre, un gas muy reactivo que muestra una alta afinidad por las metaloproteínas, incluyendo especialmente las hemoproteínas ferrosas. El NO se une muy fuertemente a la leghemoglobina. En nódulos, se ha detectado la presencia de compuestos como nitrosilleghemoglobina y leghemoglobina férrica, cuyo mecanismo de formación es desconocido y que pueden interferir en la función de la leghemoglobina ferrosa en la fijación de N_2 . Por todas estas razones encontramos de gran interés investigar la presencia de este enzima en los nódulos.

En 1994 nuestro laboratorio presentó (Martín y col., 1994) datos preliminares sobre la presencia de una actividad óxido nítrico sintasa, que co-localiza con NADPH- diaforasa en los haces vasculares de raíces y nódulos y en las células infectadas del nódulo de *Lupinus* (Figuras 32 y 33). Esta era la primera vez que se indicaba la presencia de este sistema enzimático en plantas. Hasta ese momento se había estudiado intensamente la presencia de NOS en mamíferos, se había caracterizado y clonado en diferentes tejidos animales. Sin embargo, en tejidos vegetales, había una falta de información referente a la producción de NO. Sucesivamente aparecieron publicaciones describiendo la presencia del enzima en hongos (Werner-Felmayer y col., 1994) y tejidos embrionarios de guisante (Sen y Cheema, 1995). En 1996 presentamos datos (Cueto y col., 1996) evidentes de la presencia en plantas superiores de un sistema enzimático productor de NO similar al que existe en células animales. En raíces y nódulos de *Lupinus albus* se ha demostrado la síntesis de NO y L- ^{14}C -citrulina de una manera dependiente de L-arginina. La síntesis de L- ^{14}C -citrulina es inhibida competitivamente por N-monometil arginina (NMMA) un antagonista e inhibidor de óxido nítrico sintasa en células animales (Figura 34).

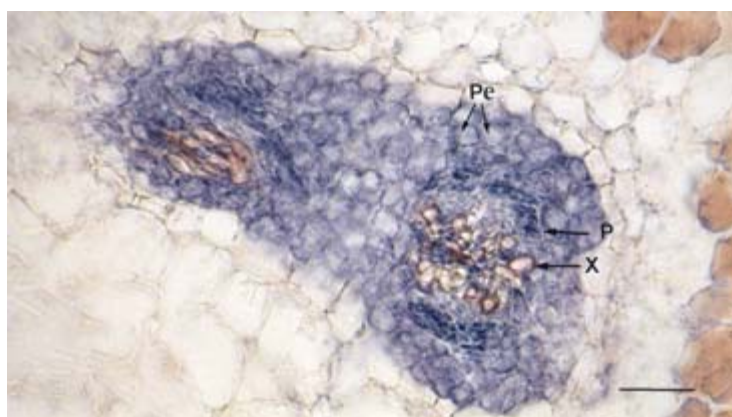


FIGURA 32. Localización histoquímica de NADPH-Diaforasa en nódulos de lupinos. Vista de un corte transversal mostrando tinción específica en haces vasculares; P, floema; PE, periciclo; X, xilema. Barra 50: μm .

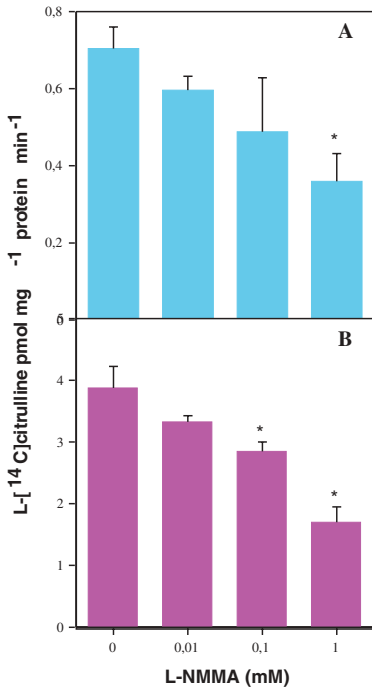


FIGURA 33. Inhibición por L-NMMA de la formación de L-[¹⁴C]citrulina a partir de L-[¹⁴C]arginina en extractos proteínicos de raíces (A, 52 µg) y nódulos (B, 69 µg) de lupino. Las mezclas de reacción fueron incubadas en presencia de L-NMMA (0.01; 0.1; 1 mM). Los valores son medias ± SE (barra) de tres experimentos diferentes con dos réplicas. * Significación ($P < 0.05$ student's test $n = 3$).

Posteriormente a nuestras investigaciones, han aparecido otros trabajos que describen la activación de óxido nítrico sintasa en procesos de interacción planta-patógeno, concluyendo que el NO juega un papel importante en la resistencia a enfermedades y en la inducción de genes de defensa. Aunque la función del óxido nítrico en las plantas es todavía muy poco conocida, es posible que, como en los mamíferos, intervenga en mecanismos de regulación e intercomunicación entre las células. Estos estudios demuestran, además la conservación de los sistemas de transducción de señales entre el reino animal y vegetal. Trabajos recientes atribuyen al NO un papel clave como mediador en las respuestas a varios estreses bióticos y abióticos, lo que brinda nuevas oportunidades a la manipulación de las plantas en la producción agrícola.

2. IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *BRADYRHIZOBIUM* EN NÓDULOS: ASPECTOS APLICADOS SOBRE COMPETITIVIDAD EN EL CAMPO

Para incrementar la fijación de nitrógeno en leguminosas se necesitan cepas de bacterias competitivas, seleccionadas por su mayor capacidad de fijar nitrógeno en las raíces. Estas cepas una vez inoculadas en las semillas, antes de la siembra, deberán competir en la rizosfera con las bacterias endógenas del suelo.

En esta competición las cepas autóctonas tienen más posibilidades de lograr infectar a las raíces, debido a que viven en el suelo y están mejor adaptadas a las condiciones ambientales de la zona que las cepas inoculadas.

Se hace necesario conocer qué cepas colonizan la raíz y han sido responsables del establecimiento de la simbiosis. Para ello aplicamos técnicas serológicas y técnicas de inmunocitoquímica (Lucas, 1990).

El trabajo se llevó a cabo en plantas de *Lupinus albus* L. cv Multolupa, inoculadas con dos cepas de *Bradyrhizobium*: ISLU 65, facilitada por la Estación Experimental de San José de la Rinconada (Sevilla), y Hig 5₂, aislada de plantas de lupino crecidas en la Finca Experimental «La Higuera» (Santa Olalla, Toledo), donde llevamos a cabo el trabajo experimental.

Se obtuvieron anticuerpos policlonales frente a cultivos bacterianos de las distintas cepas de *Bradyrhizobium*. Los anticuerpos se emplearon para la identificación por ELISA (Enzyme Linked-Immunsorbent Assay) de las cepas que formaban los nódulos, y también se usaron para estudiar por técnicas inmunocitoquímicas la localización y distribución de las cepas en el interior del nódulo (Lucas y col., 1992).

Los anticuerpos reconocieron los determinantes antigénicos de las paredes bacterianas tanto de bacteroides de nódulos maduros y senescentes (Figura 34) como de bacterias en vida libre (Figura 35 A-C). En nódulos formados por dos cepas no se observó ninguna distribución especial de cada una de ellas (Figura 35 C, D, E). Ambos coexistían en las células infectadas, aunque una de ellas

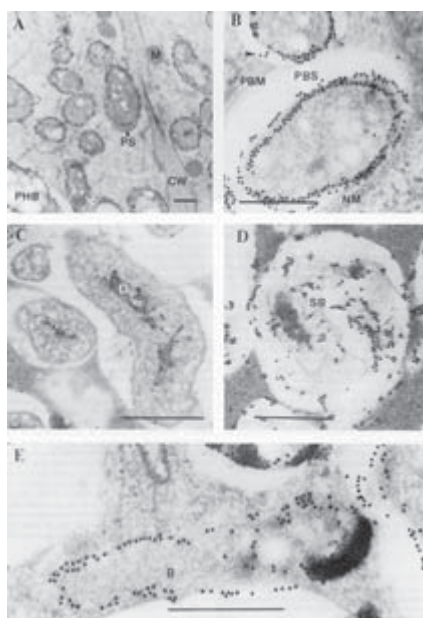


FIGURA 34. Microfotografías electrónicas mostrando secciones de nódulos de *Lupinus* inmunomarcado con oro coloidal al emplear 5 $\mu\text{g/mL}$ de IgG anti-cepa ISLU 65. **A**, Células de la cepa ISLU 65 inmunomarcadas. La pared celular y las mitocondrias no presentan marcaje. **B**, Inmunoreacción en material del espacio peribacteroidal (flecha). **C**, Partículas de oro en fibrillas del DNA de bacteroides de la cepa Hig 5₂. **D**, Inmunomarcado de bacteroides senescentes de ISLU 65. **E**, Bacteria ISLU 65 no diferenciada. B, bacteria no diferenciada; CW, pared celular; D, DNA; M, mitocondria; NM, membrana del núcleo; PBM, membrana peribacteroidal; PBS, espacio; PHB, poli- β -hidroxibutirato; PS, espacio peribacteroidal; SB, bacteroides senescentes. Barra: 0,5 μm .

siempre era mayoritaria. Por primera vez se utilizaron estas técnicas para estudiar la cohabitación de cepas en nódulos de leguminosas. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Trinick y col. (1989) en una no leguminosa, *Parasponia andersonii*, en el sentido de que en esta planta cuando dos bacterias de la misma especie colonizan el nódulo, se encuentran en células infectadas diferentes.

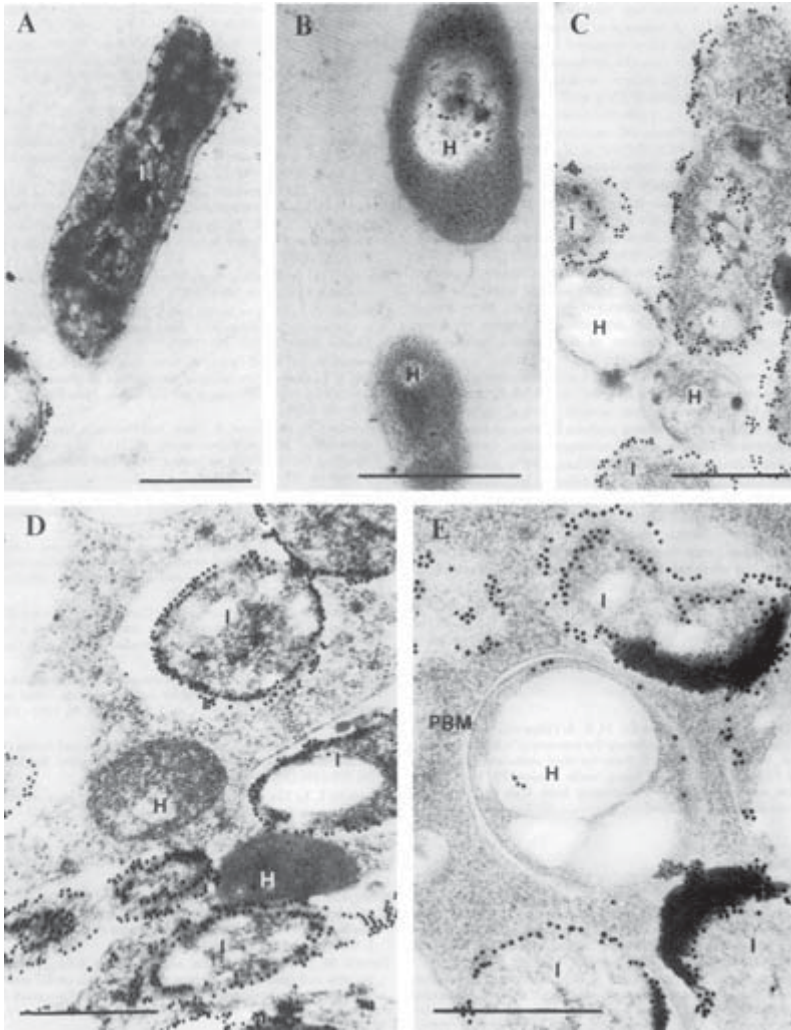


FIGURA 35. Inmunoidentificación de cepa ISLU 65 en cultivo y en nódulos de altramu. La detección se llevó a cabo con 5 $\mu\text{g/mL}$ de IgG anti-cepa ISLU 65. **A**, Inmunomarcado de bacterias ISLU 65 en vida libre. **B**, Células en vida libre de la cepa Hig 5₂. **C** ISLU 65 y Hig 5₂ crecidas conjuntamente en medio de cultivo. **D** y **E**, Secciones de nódulos mostrando células ocupadas por ambas cepas ISLU 65 y Hig 5₂. H, Hig 5₂; I, ISLU 65. Barra: 0,5 μm .

3. ALCALOIDES DE LUPINO

Las semillas de lupino fueron usadas por los pobladores indígenas de los pueblos suramericanos para su alimentación, y hoy día la población indígena sigue cultivando lupino en grandes extensiones, como base de su alimentación. En la antigüedad el pueblo inca llevaba las semillas en bolsas de tela a las cascadas de los ríos para lavarlas y evitar el sabor amargo. Este sabor amargo se lo confiere su contenido en alcaloides cuando sobrepasa el 1-2% del peso de la semilla.

Los alcaloides de lupino pertenecen al grupo de las «quinolizidinas», siendo la lupanina, esparteina y multiflorina con sus respectivos derivados las más comunes (Wink, 1994). Las semillas de *Lupinus albus* cv Multolupa son semillas dulces, obtenidas mediante mejora genética tradicional por el Doctor Van Vauer en Chile con un contenido de alcaloides por debajo del 1%.

La presencia de alcaloides en plantas ha sido ampliamente estudiada por ser estos compuestos químicos, de aplicación en Medicina y por su alta toxicidad. Sin embargo no se había realizado la localización *in situ* anteriormente a nuestro trabajo.

Antes de aplicar las técnicas de localización *in situ*, comenzamos por estudiar la estructura de las semillas observando que están constituidas únicamente por dos cotiledones y el eje hipocotilo-radícula y carecen de endospermo. En secciones ultrafinas se observan diferentes tipos de cuerpos proteicos en los cotiledones. Los cuerpos proteicos, a su vez, contienen inclusiones cristalinas de globoides, cristaloides y otras inclusiones minerales.

La inmunolocalización de alcaloides la hemos realizado en colaboración con el Doctor Greirson (Australia), que obtuvo el anticuerpo antilupanina, mediante técnicas ELISA desarrolladas para este fin. El anticuerpo tiene una alta especificidad para lupanina e hidroxilupanina que son los alcaloides mayoritarios en las semillas de lupino.

El trabajo consistió en realizar la localización en tres especies de lupino, con diferente contenido de alcaloides: *Lupinus albus* cv Multolupa, *L. augustifolius* cv 19 y *L. luteus* cv 266, facilitadas por la Estación Experimental La Orden (Badajoz). Solamente el cultivar Multolupa es una variedad dulce, los otros dos cultivares son variedades amargas.

Dado que los alcaloides son solubles en agua, los tejidos fueron procesados para la inmunolocalización por técnicas de fijación e inclusión convencional y por criotécnicas, buscando la mayor preservación de los antígenos y la inmovilidad de sus lugares de origen.

La criotécnica aplicada fue el «freeze-sustitution», en la que la fijación se realiza por inmersión de las muestras en propano líquido enfriado a -190°C en nitrógeno líquido, la deshidratación en acetona pura a -90°C y la inclusión en

resinas acrílicas, LR White (London Resin, London U.K.). De las muestras incluidas se obtuvieron secciones de 1 μm y 70 nm para la inmunolocalización a nivel de microscopio óptico y electrónico respectivamente.

Para reconocer el anticuerpo primario, antilupanina, utilizamos un anticuerpo secundario unido a oro coloidal, «Au-antidonkey», que puede ser visualizado al microscopio electrónico, ya que el oro coloidal es opaco a los electrones. Sin embargo para la identificación al microscopio óptico, las secciones han de someterse posteriormente a la intensificación con plata por el método de «silver enhancement» (Inten SEM Silver Enhancement Kit), por no poder detectarse las partículas de oro al microscopio óptico.

3.1. Estructura morfológica de los cotiledones

La estructura de los cotiledones difiere en las tres variedades de semillas estudiadas. Las células de los cotiledones de las semillas de *L. angustifolius* tienen más engrosadas (mayor contenido en celulosa y lignina) las paredes que las de *L. luteus* y *L. albus* (Figura 37). Estos engrosamientos son especialmente visibles alrededor de los espacios intercelulares, resultados que coinciden con la valoración agronómica de esta variedad de lupino que tiene fama de ser más dura que las otras (Guerrero, 1984). Los cuerpos proteicos y las vesículas de lípidos ocupan la mayor parte de las células, estando estas últimas situadas alrededor de los cuerpos proteicos (Figura 36).

Se realizó la cuantificación morfológica de los cuerpos proteicos y del grosor de las paredes celulares de las tres especies por Análisis de Imagen. Se observó que el tamaño de los de *L. albus* es significativamente mayor que *L. angustifolius* y *L. luteus*. También el número de cuerpos proteicos fue mas alto en *L. albus* (Tabla 1).

TABLA 1. *Parámetros de cuerpos proteicos y grosor de las paredes celulares de las semillas. Valores medios con desviaciones standard*

Especie	Parámetros cuerpos proteicos		Pared celular (m)	
	Area (μ^2)	n.º de perfiles/ célula	alrededor de los espacios interc.	contacto entre células
<i>L. albus</i>	120.78 \pm 16.59	21.75 \pm 3.59	2.50 \pm 0.28	1.20 \pm 0.37
<i>L. angustifolius</i>	69.10 \pm 8.15	11.43 \pm 2.70	5.98 \pm 1.31	1.17 \pm 0.69
<i>L. luteus</i>	80.73 \pm 10.67	5.50 \pm 3.58	2.36 \pm 0.69	0.97 \pm 0.60

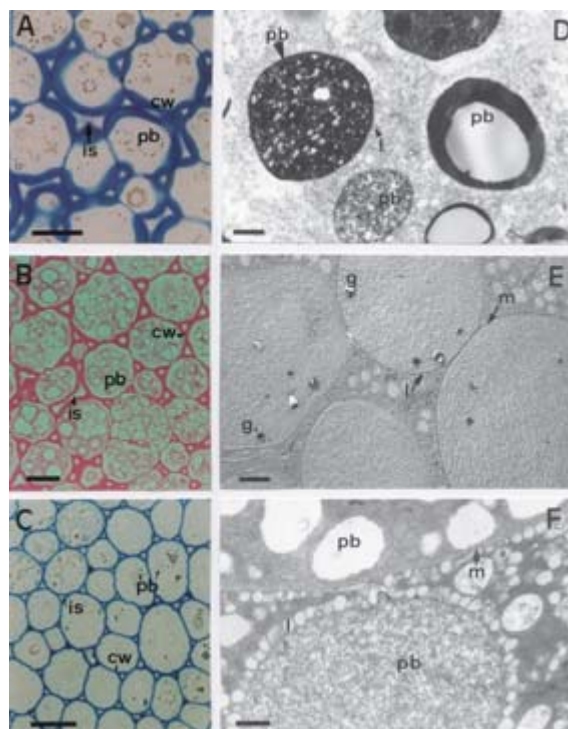


FIGURA 36. Células de cotiledones de *Lupinus*. **A, C, D, y F**, muestras fijadas por métodos convencionales, **B y E**, muestras criofijadas. **A-C**, microfotografías de microscopía óptica. **A y C**, teñidas con azul de toluidina. **B**, Reacción de Schiff. **A**, muestra paredes más engrosadas que *L. luteus* (B) y *L. albus* (C) rodeando los espacios intercelulares. **D-F**, microfotografías de microscopía electrónica. **D**, diferentes tipos de cuerpos proteicos de *L. angustifolius*. **E**, células de cotiledones de *L. luteus*. **F**, cuerpos proteicos de *L. albus*. Cw, pared celular; g globoides; is espacio intercelular; l, vesículas de lípidos; m, membrana de cuerpos proteicos; pb, cuerpos proteicos. Barras: A-C, 50 μm ; D-F, 1 μm .

Los cuerpos proteicos se observan morfológicamente diferentes entre las tres especies (Figura 37). En *L. angustifolius* y *L. luteus* predominan las inclusiones de tipo globoide y paracristalino. Por el contrario en *L. albus* la matriz es más uniforme de naturaleza proteinacea, sin apenas inclusiones cristalinas (Figura 33 F). Es probable que la mejora genética para obtener el lupino dulce (*L. albus* cv Multolupa) haya redundado en el predominio de una matriz homogénea de naturaleza proteica, con una baja concentración de alcaloides.

3.2. Inmunolocalización de alcaloides

La Figura 37 muestra la localización de alcaloides al microscopio óptico. Los alcaloides fueron localizados en los cuerpos proteicos preferentemente en la

matriz de estos orgánulos. Alguna localización fue también encontrada en las paredes celulares de los cotiledones (Figura 37 A, B). No se encontró localización en el citosol de las células de los cotiledones.

Se observó una localización más intensa en *L. angustifolius* y en *L. luteus* que en *L. albus*, ya que se trata de la variedad dulce, pobre en alcaloides. La localización de alcaloides está distribuida sobre la matriz del cuerpo proteico. La localización en los cuerpos proteicos que contienen globoides está principalmente relacionada sobre la zona densa de los cuerpos proteicos.

La localización al microscopio óptico fue confirmada por el microscopio electrónico (Figura 38). La Figura 38 A muestra la inmunolocalización en la matriz oscura de un cuerpo proteico de *L. angustifolius*. La localización es específica en esta zona, mientras que en *L. luteus* se observan algunas partículas de oro dispersas sobre otras áreas del cuerpo proteico (Figuras 38 D). Presencia de alcaloides también fue observada sobre las paredes celulares de las células de los cotiledones, pero no se encontró localización en el citosol de estas células al igual que al microscopio óptico.

Dada la solubilidad de los alcaloides, era de esperar que el procesamiento con criotécnicas rindiera una mayor localización, observando un número ligeramente mas alto de granitos de oro en las muestras crioprocesadas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a los lugares de localización entre ambas técnicas.

De estos resultados se deduce que los alcaloides en las semillas de lupino se encuentran unidos a proteínas, característica que les hace ser menos solubles en agua que si estuvieran libres. Los alcaloides están acumulados mayoritariamente en los cuerpos proteicos que pueden actuar como vacuolas de almacenamiento.

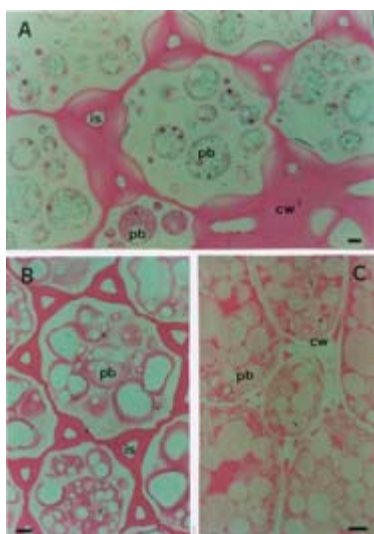


FIGURA 37. **A-C**, Inmunolocalización de lupanina detectada por silver enhancement y tinción con fuchina en microscopía óptica. **A**, *L. angustifolius* fijada con métodos convencionales. **B** y **C**, *L. luteus* y *L. albus* criofijados. Las partículas de oro colooidal pueden ser detectadas en los cuerpos proteicos y en las paredes celulares. Cw, pared celular; is espacio intercelular; pb cuerpo proteico. Las flechas indican inmunolocalización. Barras: A y B 300 μ m. C: 900 μ m.

3.3. Determinación mineral en los cuerpos proteicos

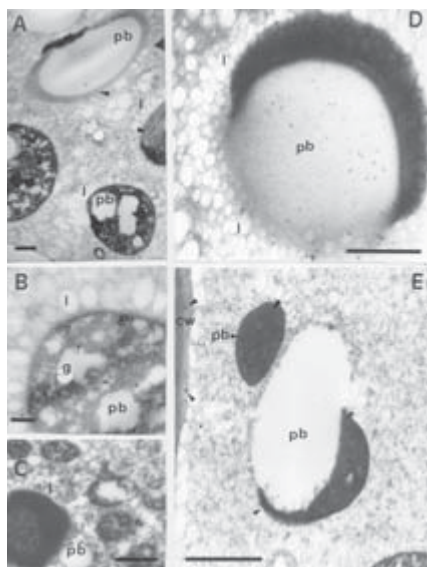


FIGURA 38. Microfotografías electrónicas mostrando inmunolocalización de lupanina (flechas) en cotiledones de lupino. **A-C y E**, muestras fijadas por métodos convencionales; **D**, muestra criofijada. **A**, Diferentes tipos de inmunomarcado en cuerpos proteicos de *L. angustifolius*. **B**, Inmunomarcado de un cuerpo proteico de *L. angustifolius* con globoide. *L. angustifolius* de la reacción inmune usando suero preinmune. **D**, Cuerpo proteico de *L. luteus* mostrando dos áreas con diferente densidad a los electrones. **E** Inmunolocalización de alcaloides en cuerpos proteicos y pared celular de *L. albus*. cw, pared celular; l, vesículas de lípidos; m, membrana de los cuerpos proteicos; pb, cuerpo proteico. Barra 0,5 μ m.

Paralelamente a la localización de los alcaloides en las semillas hemos estudiado también el análisis cualitativo y cuantitativo de algunos elementos minerales en los cuerpos proteicos de las tres especies de lupino, por Microanálisis de Rayos X (espectrometría de energía dispersiva, EDAX), técnica que como se mencionó en el preámbulo identifica los elementos en los tejidos, por su número atómico característico y permite también su cuantificación *in situ*.

El análisis de los cotiledones reveló la presencia de P, Mg, S y K en los cuerpos proteicos en las tres especies de lupino (Figura 39). El potasio es el elemento más abundante, siendo el *L. angustifolius* la especie con un contenido de K significativamente más alto.

Wink (1993) encontró que los dos primeros enzimas de la biosíntesis de alcaloides de las quinolizidinas se localizan en el estroma de los cloroplastos de la hoja. Si el lugar original de la síntesis de alcaloides son las hojas, su transporte a las semillas para ser almacenados en los cuerpos proteicos necesitará un gran aporte de energía. Este transporte podría ser dependiente de Mg^{+} ATP y K^{+} que actuaría sobre la permeabilidad de las membranas para facilitar el transporte. Los altos contenidos de K^{+} encontrados en el análisis elemental de las semillas pueden estar justificados para realizar esta función.

A modo de conclusión podemos afirmar: a) que los alcaloides se localizan en los cuerpos proteicos de las semillas de lupino, b) que están fuertemente unidos a proteínas, y c) que los cuerpos proteicos funcionan como reservorios de alcaloi-

des, con la misma función que las vacuolas de las células. Probablemente desde estos compartimientos los alcaloides actúan como metabolitos secundarios en defensa de la planta contra predadores de semillas y plántulas en el campo.

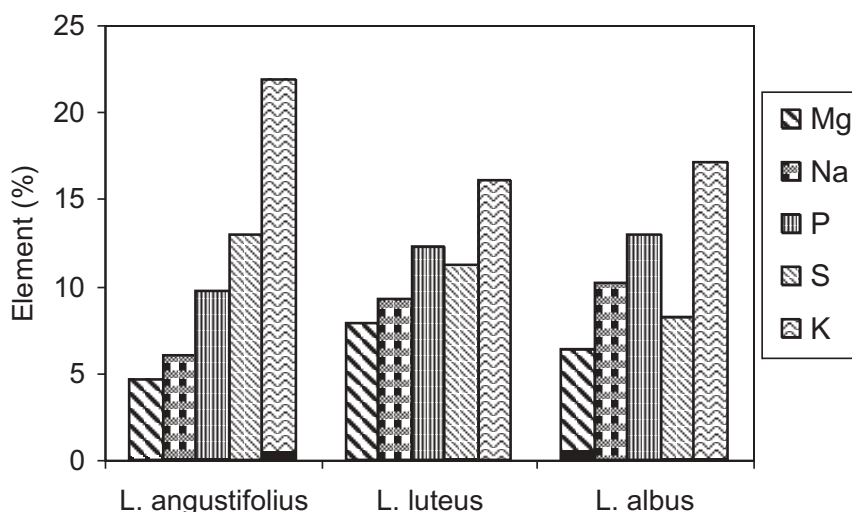


FIGURA 39. Comparación de la composición elemental de semillas de lupino obtenida mediante microanálisis de Rayos X. Los resultados están expresados en porcentaje de la composición mineral total de los cuerpos proteicos para cada especie de lupino.

4. PERSPECTIVAS

En las últimas Reuniones Internacionales sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, las consideraciones finales han incidido en dos aspectos fundamentales: A) Profundizar en los mecanismos básicos del proceso para conocer los factores clave implicados en el mismo, y B) Extender esta biotecnología a plantas no leguminosas, obteniendo nuevas simbiosis.

Ambos aspectos están estrechamente relacionados, pues para conseguir que plantas no leguminosas fijen nitrógeno, es preciso un gran conocimiento de los factores que determinan la simbiosis. Este es un reto pendiente para los que trabajamos en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Nuestro interés en profundizar en la simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*, se basa en este mismo objetivo, ya que al tratarse de una simbiosis muy particular, que no sigue el patrón general de las leguminosas, podría ayudar a conocer como se pueden establecer simbiosis en plantas todavía más alejadas de las leguminosas, como los cereales (maíz, arroz, etc.). Este es un aspecto de gran interés sobre todo en países subdesarrollados, que viven de un monocultivo y su situación económica no les permite la aplicación de fertilizantes químicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- BECANA, M. and KLUCAS, R. V. (1992): Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proceedings National Academy Sciences USA*. **89**: 8958-8962.
- CABEZAS DE HERRERA, E. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (1982): Ultrastructural changes produced during the development of soybean root nodules. *Phytopathologische Zeitschrift*, **106**: 173-185.
- CARPENA, R.; S. VÁZQUEZ; E. ESTEBAN; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL; M. R. DE FELIPE and P. ZORNOZA (2003): Cadmium-stress in white lupin: Effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiology and Biochemistry*. **41**: 911-919 y portada.
- CUETO M.; O. HERNÁNDEZ-PERERA; R. MARTÍN; M. L. BENTURA; J. RODRIGO; S. LAMAS and M. P. GOLVANO (1996): Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*. **398**: 159-164.
- DE FELIPE, M. R.; M. M. LUCAS and J. M. POZUELO (1988): Cytochemical study of catalase and peroxidase activities in the mesophyll of *Lolium rigidum* Gaud. plants treated with isoproturon. *Journal of Plant Physiology*. **132**: 67-73.
- DE FELIPE, M. R.; M. M. LUCAS; J. P. LECHAIRE; G. NICOLAS; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL and J. M. POZUELO (1997): Comparative study of two cryotechnique to elucidate real functional aspects of legume nodules development. *Journal Plant Physiology*. **150**: 428-436.
- DE LORENZO, C.; M. M. LUCAS; A. VIVO and M. R. DE FELIPE (1990): Effect of nitrate on peroxisome ultrastructure and catalase activity in nodules of *Lupinus albus* L. cv Multolupa. *Journal of Experimental Botany*. **41**: 1573-1578.
- DE LORENZO, C. (1992): *Efecto de la aplicación de nitrato sobre la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno y sobre el metabolismo de especies tóxicas de oxígeno en nódulos de lupino*. Tesis Doctoral. ETSIA. Madrid.
- DE LORENZO C.; P. P. M. IANNETTA; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL; E. K. JAMES; M. M. LUCAS; J. I. SPRENT; J. F. WITTY; F. R. MINCHIN and M. R. DE FELIPE (1993): Oxygen diffusion in lupin nodules. II. Mechanisms of diffusion barrier operation. *Journal of Experimental Botany*. **44**: 1469-1474.
- DE LORENZO, C.; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL and M. R. DE FELIPE (1998): Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma* **201**: 71-84.
- DE MARÍA, N. (2004): *Efecto del glifosato sobre la simbiosis Lupinus albus-Bradyrhizobium sp.* (Lupinus). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- DE MARÍA, N.; J. M. BECERRIL; J. I. GARCÍA-PLAZAOLA; A. HERNÁNDEZ; M. R. DE FELIPE and M. FERNÁNDEZ-PASCUAL (2006): New Insights on Glyphosate Mode of Action in Nodular Metabolism: The Role of Shikimate Accumulation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **54**: 2621-2628.
- FEDOROVA, E.; F. J. REDONDO; T. KOSHIBA; M. R. DE FELIPE; J. J. PUEYO and LUCAS, M. M. (2005): Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and *Medicago truncatula*: Identification of AO in meristematic and infection zones. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **18**: 405-413.
- FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (1984): *Estudio de determinados factores responsables de la especificidad Rhizobium-leguminosa*. Facultad de Ciencias Biológicas. U. Complutense de Madrid.
- FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; C. DE LORENZO; M. R. DE FELIPE; S. RAJALAKSHMI; A. J. GORDON; B. J. THOMAS and F. R. MINCHIN (1996): Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *Journal of Experimental Botany*. **47**: 1709-1716.

- FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; M. M. LUCAS; M. R. DE FELIPE; L. BOSCA; H. HIRT and M. P. GOLVANO: Involvement of Mitogen-activated Protein Kinases in the Symbiosis Bradyrhizobium-Lupinus. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2735-2742.
- GONZÁLEZ-SAMA, A. (2003): *Procesos iniciales del establecimiento de la simbiosis Lupinus albus-Bradyrhizobium sp.* (Lupinus). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias (Sección Biológicas). Universidad Autónoma de Madrid.
- GONZÁLEZ-SAMA, A.; M. M. LUCAS; M. R. DE FELIPE and J. J. PUEYO (2004): An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist*. **163**: 371-380.
- GUASCH, L. M. (1998): *Factores estructurales fisiológicos y genéticos en la regulación de la difusión de oxígeno en nódulos de Lupinus albus L. cv. Multolupa*. Tesis Doctoral. ETSIA. Madrid.
- GUASCH, L.M.; M. R. DE FELIPE and M. FERNÁNDEZ-PASCUAL (2001): Effects of different O₂ concentrations on nitrogenase activity, respiration and O₂ diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv Multolupa nodules. *Journal of Plant Physiology*. **158**: 1395-1402.
- GUERRERO, A. (1984): *Cultivos herbáceos extensivos*. Eds. Mundi-Prensa. Madrid. ISBN: 84-7114-064.
- HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M. J. (1998): *Alteraciones del metabolismo oxidativo en la senescencia natural e inducida por oscuridad en nódulos de Lupinus albus L. Cv. Multolupa*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M. J.; M. M. LUCAS and M. R. DE FELIPE (2002): Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiology and Biochemistry*. **40**: 645-657.
- IANNETTA, P. P. M.; C. DE LORENZO; E. K. JAMES; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL; J. I. SPRENT; M. M. LUCAS; J. F. WITTY; M. R. DE FELIPE and F. R. MINCHIN (1993): Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation. *Journal Experimental Botany*. **44**: 1461-1467.
- KATINAKIS, P.; R. M. KLEIN LAKHORST; J. LOUWERSE, A. VAN KAMMEN and R. C. VAN DEN BOSCH (1988): Bacteroid-encoded proteins are secreted into de peribacteroid space by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Molecular Biology*. **11**: 183-190.
- KO M. P.; P. Y. HUANG; J. S. HUANG and K. R. BAKER (1985): Accumulation of phytoferritin and starch granules in developing nodules of soybean roots infected with *Heterodera glycines*. *Phytopathology*. **75**: 159-164.
- LANG, P. (1990): *Efecto del nitrato sobre la fijación de nitrógeno y sobre el metabolismo del carbono en nódulos de Lupinus albus L. cv. Multolupa*. Tesis Doctoral Universidad Complutense, Madrid.
- LANG, P.; R. MARTÍN and M. P. GOLVANO (1993): Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in lupin root (*Lupinus albus* cv. Multolupa). *Plant Physiology and Biochemistry*. **31**: 639-648.
- LUCAS, M. M. (1990): *Influencia de la fertilización fosfatada sobre la simbiosis Lupinus albus L.-Bradyrhizobium sp.* (Lupinus). Producción y competitividad. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Editado por la Universidad Complutense de Madrid.
- LUCAS, M. M.; A. VIVO and J. M. POZUELO (1992): Application of immunolabelling techniques to *Bradyrhizobium* dual occupation in *Lupinus* nodules. *Journal of Plant Physiology*. **140**: 84-91.
- LUCAS, M. M.; G. VAN DE SYPE; D. HÉROUART; M. J. HERNÁNDEZ; A. PUPPO and M. R. DE FELIPE (1998): Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma*. **204**: 61-70.
- MARTÍN, R.; R. MARTINEZ-MURILLO; M. L. BENTURA; J. RODRIGO and M. P. GOLVANO (1994): Presence of the enzyme nitric oxide synthase in root nodules of lupine plants (*Lupinus albus* cv. Multolupa). *Biologia Plantarum*. **36** (suppl.): 1917.

- MONCADA, S.; R. M. J. PALMER and E. A. HIGGS (1991): Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology. Review.* **43**: 109-142.
- MOOR, H. (1987): Theory and practise of High Pressure Freezing. En: Steinbrecht, R. A. and Zierold (eds.): *Criotechniques in Biological Electron Microscopy*, pp. 175-191. Springer, Berlin.
- MUELLER, W. C. and C. H. BECKMAN (1978): Ultrastructural localization of polyphenoloxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany.* **56**: 1578-1587.
- PASTOR, J.; HERNÁNDEZ, A. J.; N. PRIETO and M. FERNÁNDEZ-PASCUAL (2003): Accumulating behaviour of *Lupinus albus* l. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *Journal of Plant Physiology.* **160**: 1455-1463.
- POZUELO, J. M.; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL; C. DE LORENZO; C. MOLINA y M. R. DE FELIPE (1993): *Estudios comparativos de fijación Biológica de nitrógeno en tres leguminosas de zonas áridas o semiáridas*. X Reunión Nacional de la SEFV. III Congreso Hispano-Portugués de Fisiología Vegetal. Pamplona.
- POZUELO, J. M.; M. M. LUCAS; C. DE LORENZO; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL; S. MALDONADO and M. R. DE FELIPE (2001): Immunolocalization of alkaloids and X-ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma.* **218**: 104-111.
- PUPPO, A.; K. GROTEN; F. BASTIEN; M. SOUSSI; M. M. LUCAS; M. R. DE FELIPE; J. HARRISON; H. VANACKER and C. H. FOYER (2005): Legume root nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *The New Phytologist.* **165**: 683-701.
- SEN, S. and CHEEMA, I. R. (1995): Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embrionic tissues. *Biochemical Archives.* **11**: 221-227.
- STUDER, D.; H. HENNECKE and M. MÜLLER (1992): Hig-pressure freezing of soybean nodules leads to an improved preservation of ultrastructure. *Planta* **188**: 155-163.
- THEIL, E. C. (1987): Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annual Review of Biochemistry.* **56**: 289-315.
- TRINICK, M. J.; D. J. GOODCHILD and C. M. MILLER (1989): Localization of bacteria and hemoglobin in root nodules of *Parasponia andersonii* containing both *Bradyrhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied Environmental Microbiology.* **55**: 4046-2055.
- VANDENBOSCH, K. A. and NEWCOMB, E. H. (1986): Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root nodules. *Planta* **167**: 425-451.
- VANDENBOSCH, K. A.; D. J. BRADLEY; J. P. KNOX; S. PEROTTO; G. W. BUTVHER and N. J. BREWIN (1989): Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identify by immunochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO Journal.* **8**: 967-978.
- VIVO, A.; J. M. ANDREU; S. DE LA VIÑA and M. R. DE FELIPE (1989): Leghaemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* L. cv. Multolupa). *Plant Physiology.* **90**: 452-457.
- WERNER-FELMAYER, G.; G. GOLDERER; E. R. WERNER; P. GRÖBNER and H. WACHTER (1994): Pteridine biosynthesis and nitric oxide syntase in *Physarum polycephalum*. *Biochemical Journal.* **304**: 105-111.
- WINK, M. (1993): The plant vacuole: a multifunctional compartment. *Journal of Experimental Botany.* **44**: 231-246.
- WINK, M. (1994): Biological activities and potential application of lupin alkaloids. In: Neves-Martins JM and Beirao da Costa (eds) *Advances in lupin Research*. ISA Press. Lisbon, 161-178.
- ZORNOZA, P.; S. VÁZQUEZ; E. ESTEBAN; M. FERNÁNDEZ-PASCUAL and R. CARPENA (2002): Cd-stress in nodulated white lupin: Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry.* **40**: 1003-1009.